

Vicente Lieberknecht

**EFEITO NEUROPROTETOR DO PRAMIPEXOL, AGONISTA
DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2/D3, NOS
MODELOS DE ESCLEROSE MÚLTIPLA E DE DEPRESSÃO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra

Florianópolis, 30 de setembro de 2016.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lieberknecht, Vicente

EFEITO NEUROPROTETOR DO PRAMIPEXOL, AGONISTA DE
RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2/D3, NOS MODELOS DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA E DE DEPRESSÃO / Vicente Lieberknecht ;
orientador, Alcir Luiz Dafre ; coorientador, Rafael
Cypriano Dutra. - Florianópolis, SC, 2016.
166 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

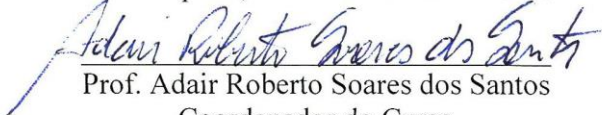
1. Neurociências. 2. Neuroinflamação. 3. Sistema
dopaminérgico. 4. Esclerose Múltipla. 5. Depressão. I.
Dafre, Alcir Luiz. II. Dutra, Rafael Cypriano. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Neurociências. IV. Título.

VICENTE LIEBERKNECHT

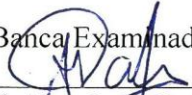
**“EFEITO NEUROPROTETOR DO PRAMIPEXOL,
AGONISTA DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS
D2/D3, NOS MODELOS DE ESCLEROSE MÚLTIPLA E
DE DEPRESSÃO”**


Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina

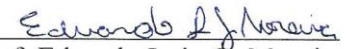
Florianópolis, 30 de setembro de 2016.



Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof. Alcir Luiz Dafre
Orientador – UFSC

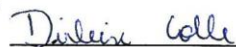

Prof. André R. da Silva Colla
Membro da Banca Externo



Prof. Eduardo Luiz G. Moreira
Membro – UFSC


Profa. Fabiana K. Ludka
Membro da Banca Externo


Profa. Manuella Pinto Kaster
Membro – UFSC


Prof. Marcelo L. Schwarzbold
Membro – UFSC


Dra. Dirleise Colle
Membro – UFSC (suplente)


Profa. Josiane Budni
Membro da Banca Externo (suplente)

Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim e em especial à minha família, que me deu todo o suporte e possibilitou este momento.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio e carinho.

Ao professor Alcir Luiz Dafre, por toda orientação que não foi apenas a nível laboratorial, e amizade.

Ao professor Rafael C. Dutra, pelos conhecimentos passados.

À professora Ana Lucia Severo Rodrigues, pela amizade, confiança e colaboração prestada.

Ao professor Adair Roberto Soares dos Santos, pela colaboração nos trabalhos.

Aos professores do PPG em Neurociências e Bioquímica que direta ou indiretamente ajudaram durante este percurso.

Aos meus colegas e amigos Mauricio Peña Cunha, Stella Célio Junqueira, Igor dos Santos Coelho, Thaís Alberti Barbosa, Luiz Felipe de Souza pela colaboração nos trabalhos e amizade.

Aos colegas, e amigos, do laboratório de defesas celulares, Danielle F. Mello, Rafael Trevisan, Naissa M. Danielli, Ariana E. Schimitz, Jozimar C. Szczepanik e Gudrian L. Almeida. Por toda amizade, todos foram muito importantes durante todo este período, e assim continuarão sendo, sempre.

Aos colegas e amigos do LANED, Francis Leonardo Pazzini, Julia Macedo, André Roberto da Silva Colla, Aline Siteneski pela amizade, colaboração e respeito.

Ao Nivaldo, pelo seu bom trabalho, tratamento, amizade e auxílio prestado.

Aos meus amigos, estejam eles perto ou longe, sempre estaremos juntos.

Aos funcionários do Laboratório Multiusuário I e II
A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta etapa.

O Deus átomo repousa nas rochas,
Cresce nas plantas,
Anda nos animais,
Pensa nos homens,
Ama nos anjos...
Por isso, respeite:
As rochas como se fossem plantas,
As plantas como se fossem animais,
Os animais como se fossem homens e
Os homens como se fossem anjos.

“Inscrição Rupestre-Tibet-3000 A.C.”

RESUMO

As doenças de Parkinson, de Alzheimer e esclerose múltipla (EM), bem como os transtornos de humor, como a depressão, apresentam componentes inflamatórios. As células do sistema imune possuem 5 receptores que respondem ao neurotransmissor dopamina, os quais modulam diferentemente a inflamação. Assim, é esperado que o pramipexol (PPX), um agonista de receptores dopaminérgicos (D2/D3), tenha efeito imunomodulatório. Para testar essa hipótese foram utilizados dois modelos que causam neuroinflamação: a) a encefalomielite autoimune experimental (EAE), modelo de esclerose múltipla e b) a administração periférica de lipopolissacarídeo (LPS), modelo de transtorno depressivo maior. A EAE foi induzida em camundongos C57BL/6 através da administração do peptídeo 35-55 da glicoproteína de mielina oligodendroglial e o PPX (0,1 e 1 mg/kg/dia) foi administrado pela via intraperitoneal por 40 dias. A dose de 1 mg/kg inibiu completamente o surgimento dos sinais motores induzidos pela EAE, além de prevenir a desmielinização na medula espinhal. Além disso, o PPX teve um forte efeito anti-inflamatório, confirmado através da redução da infiltração de células inflamatórias, da ativação astrogliar na medula espinhal, e da redução nos níveis de IL-17 nos linfonodos. Além disto, o PPX reverteu várias alterações induzidas pela EAE na medula espinhal e no estriado, incluindo a redução nos níveis de α -sinucleína, o aumento nos níveis de parkina, alteração na enzima glutationa peroxidase e a produção de espécies reativas de oxigênio. Em conjunto os dados sugerem que o PPX deve ser estudado como um possível agente farmacológico para tratar a EM. No modelo de depressão induzida por inflamação periférica através da injeção de LPS em camundongos Swiss, o PPX (1 mg/kg), foi administrado por 7 dias por via intraperitoneal. Uma hora após a última aplicação de PPX, injetou-se LPS (0,1 mg/kg) via intraperitoneal, 24 h depois foi dado início aos testes comportamentais. O LPS induziu comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado e no splash test, sem alterar a locomoção no teste do campo aberto. Também foi observado o aumento de Interleucina-1 β e adutos de 3-nitrotirosina no hipocampo dos animais tratados com LPS. Todos estes parâmetros foram revertidos pelo PPX, indicando que o PPX é capaz diminuir os eventos inflamatórios que podem estar

associados ao comportamento tipo-depressivo. Os antagonistas de receptores dopaminérgicos, haloperidol e sulpirida, não reverteram o efeito tipo-antidepressivo do PPX, indicando que a atuação do PPX parece não ser mediada por estes receptores. Em conjunto, os dados sugerem que o PPX é capaz de causar uma forte diminuição em processos inflamatórios, tanto no modelo de EAE como no modelo de depressão, o que pode ser o mecanismo responsável por sua ação. Porém, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Palavras-chave: neuroinflamação, doenças autoimunes, transtorno de humor, sistema dopaminérgico, pramipexol, encefalomielite autoimune experimental, lipopolissacarídeo, interleucina

ABSTRACT

Neurologic diseases as Parkinson's, Alzheimer's and multiple sclerosis (MS) as well as mood disorders, like major depression, present inflammatory components. Immune cells express 5 different dopamine receptors, which are known to modulate inflammation. In this context, it is expected that pramipexole (PPX), a dopamine D2/D3 receptor agonist, would have an immunomodulatory effect. To evaluate this hypothesis two neuroinflammatory disease models were used, the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a mice model of MS, and the peripheral administration of lipopolysaccharide (LPS), a mice model of major depression disorder (MDD). EAE was induced in C57Bl/6 mice by the injection of the 35-55 peptide of myelin oligodendroglial glycoprotein. PPX (0.1 and 1 mg/kg) was administered by intraperitoneal route for 40 days. The dose of 1 mg/kg of PPX completely abolished motor impairment induced by EAE, and prevented medular demyelination. Besides, PPX had a marked anti-inflammatory effect, which was observed by reduction of inflammatory cells infiltration, astroglial activation, and by decreasing IL-17 levels in lymph nodes. Besides, PPX reversed several alterations in the spinal cord and striatum induced by EAE, including reduction in α -synuclein levels, enhancement of parkin levels, alteration in glutathione peroxidase activity and reactive oxygen species production. Together, these results suggest that PPX can be studied as a potential drug for MS treatment. In the MDD model induced by peripheral inflammation induced with the bacterial lipopolysacchired (LPS) administration in Swiss mice, PPX (1 mg/kg) was administered for 7 days by intraperitoneal route. One hour after the last PPX injection, LPS (0.1 mg/kg) was administered intraperitoneally, and 24 h later behavioral analysis were performed. LPS induced depressive-like behavior in the forced swimming test and splash test, without locomotor alterations in the open field test. It was also observed enhancement of Interleukin-1 β and 3-nitrotyrosin protein adducts in mice hippocampus of LPS treated animals. PPX reversed all these alterations, indicating that PPX can prevent the inflammatory events related to the depressive-like behavior. Interestingly, the dopamine receptor antagonists, haloperidol and sulpiride, did not reverse the PPX antidepressant-like effect in the forced swimming test, indicating that PPX effect

seems to be unrelated by these receptors. Together, these results suggest that PPX present a marked antiinflammatory action, in both EAE and LPS models, suggesting that this could be the mechanism of action of PPX. Nevertheless, further studies are required to confirm this hypothesis.

Keywords: neuroinflammation, autoimmune diseases, mood disorders, dopaminergic system, pramipexole, experimental autoimmune encephalomyelitis, lipopolysaccharide, interleukin.

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismos moleculares envolvidos na EM.....	34
Figura 2. Representação esquemática dos procedimentos envolvidos com a indução da EAE ativa em roedores.	42
Figura 3. Metabolismo da dopamina.....	59
Figura 4. Representação das vias dopaminérgicas no encéfalo.....	62
Figura 5. Estrutura química do PPX.....	66
Figura 6. Desenho experimental do tratamento de camundongos com PPX no modelo de EAE.	77
Figura 7. Protocolo experimental da administração aguda de PPX em camundongos desafiados com o LPS e submetidos aos testes comportamentais.	79
Figura 8. Protocolo experimental da administração repetida de PPX em camundongos desafiados com o LPS e submetidos aos testes comportamentais.	80
Figura 9. Protocolo experimental para análise da participação dos receptores dopaminérgicos D2/D3 no efeito antidepressivo do PPX.....	81
Figura 10. Análise dos níveis de parkina e α -sinucleína durante o desenvolvimento da EAE.	89
Figura 11. Efeito do tratamento preventivo com PPX no desenvolvimento e progressão da EAE.....	92
Figura 12. Efeito do tratamento preventivo com PPX na algia induzida pela EAE.	94
Figura 13. Efeito do tratamento preventivo com PPX na infiltração de células inflamatórias induzida pela EAE.....	96
Figura 14. Efeito do tratamento preventivo com PPX na desmielinização induzida pela EAE.	97
Figura 15. Efeito do tratamento preventivo com PPX na ativação astrocitária induzida pela EAE.	98
Figura 16. Efeito do tratamento preventivo com PPX nos níveis de citocina pró-inflamatórias nos órgãos linfóides periféricos após o aparecimento dos sinais clínicos da EAE.	100
Figura 17. Efeitos do PPX na produção de ERO, imunocidade de GPx e atividade da GPx na medula espinhal e no estriado.....	102
Figura 18. Efeitos do PPX no imunocidade de parkina e α -sinucleína na medula espinha e no estriado.....	105
Figura 19. Efeitos dos tratamentos agudo e repetido do PPX no comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS em camundongos.....	109

Figura 20. Efeito do tratamento repetido com o PPX sobre os níveis de IL-1 β , GFAP e IL-6 no hipocampo de camundongos tratados com LPS.....	112
Figura 21. Efeito do tratamento repetido com PPX nos marcadores de estresse oxidativos e nitrosativo no hipocampo de camundongos expostos ao LPS.	113
Figura 22. Análise da ativação de receptores de dopamina pelo PPX.	115
Figura 23. Análise do papel dos receptores de dopamina D2 no comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS.	116

Lista de tabelas

Tabela 1. Funções das células T.....	24
Tabela 2. Efeitos adversos e estratégias terapêuticas dos fármacos utilizados no tratamento da EM.....	38
Tabela 3. Escore clínico da EAE.....	43
Tabela 4. Diagnóstico da TDM.....	46
Tabela 5. Antidepressivos utilizados no tratamento da TDM e seus efeitos adversos.....	49

Lista de abreviaturas

α -syn: Proteína α -sinucleína (do inglês “ α -synuclein”)
AD: Doença de Alzheimer (do inglês “Alzheimer’s disease”)
APC: Células apresentadoras de antígeno (do inglês “antigen presenting cells”)
BHE: Barreira hemato-encefálica
BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês “brain derived neurotrophic factor”)
CD: Células dendríticas
CFA: Adjuvante completo de Freund (do inglês “complete Freund’s adjuvant”)
dopamina: Dopamina
DP: Doença de Parkinson
EAE: encefalomielite autoimune (ou alérgica) experimental
EM: Esclerose Múltipla
ERO: Espécies reativas de oxigênio
ERN: Espécies reativas de nitrogênio
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GPx: Glutathione peroxidase
H2DCFDA: Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
IFN- β : Interferon beta
IFN- γ : Interferon gama
IL-x: Interleucina, onde x representa o tipo: 1 β , 6, 17, etc
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina
TDMMHC: Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês “major histocompatibility complex”)
MOG: glicoproteína de mielina de oligodendrócitos (do inglês “myelin oligodendroglial glycoprotein”)
PARK2: parkina
PINK1: Cinase 1 induzida pela PTEN (do inglês “PTEN-induced kinase 1”)
NMDA: N-metil-D-aspartato
SNC: Sistema nervoso central
SNCA: Gene da α -sinucleína
Th1, Th2 e Th17: Linfócitos T auxiliares 1, 2 e 17 (do inglês “T helper lymphocytes”)
TCA: Teste do campo aberto
TDM: Transtorno depressivo maior

TNF: Teste do nado forçado

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa (do inglês “tumoral necrosis fator”)

Treg: Linfócito T regulatório

VDAC1: Canal seletivo de ânion dependente de voltagem do tipo 1 (do inglês “Voltage-dependent anion-selective channel protein 1”)

WT – tipo selvagem (do inglês “wild type”)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Sistema imune	23
1.2. Inflamação periférica, neuroinflamação e doenças do sistema nervoso central (SNC).....	26
1.3. Esclerose Múltipla (EM).....	29
1.4. Depressão.....	45
1.4.1. Inflamação, neuroinflamação e depressão	54
1.5. A inter-relação entre os sistemas dopaminérgico e imune no decurso de doenças neurológicas	58
1.6. Pramipexol	65
2. JUSTIFICATIVA.....	68
3. OBJETIVOS.....	70
3.1. Objetivos específicos	70
3.2. Caracterização da problemática	72
3.3. Materiais e métodos.....	74
3.3.1. Animais	74
3.3.2. Agentes farmacológicos e reagentes.....	75
3.3.3. Protocolos experimentais	75
3.3.3.1. Modelo experimental de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e tratamentos com agonista D2/D3 dopaminérgico	75
3.3.3.2. Investigação do efeito antidepressivo do PPX no modelo de depressão induzida pela administração de LPS.....	77
3.3.3.3. Investigação da participação dos receptores de dopamina D2/D3 no efeito antidepressivo do PPX.....	81
3.3.4. Experimentos Comportamentais	82
3.3.4.1. Teste do nado forçado (TNF)	82
3.3.4.2. Teste do campo aberto (TCA).....	82
3.3.4.3. Splash Test.....	83
3.3.4.4. Testes de algesia.....	83
3.3.5. Análises Bioquímicas	84
3.3.5.1. Detecção de proteínas por Western e slot blot.....	84
3.3.5.2. Atividade da enzima glutationala peroxidase (GPx)	85
3.3.5.3. Ensaio do Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-dopamina).....	85

3.3.6.	Análise histológica.....	85
3.3.7.	Análise imunistoquímica.....	86
3.3.8.	Dosagem de citocinas por ELISA	86
3.3.9.	Análise estatística.....	87
3.4.	Resultados.....	87
3.4.1.	Caracterização dos níveis de parkina e α -sinucleína na EAE.....	87
3.4.2.	Efeito do PPX sobre os sintomas motores da EAE	91
3.4.3.	Efeito do PPX na algesia induzida pela EAE.....	93
3.4.4.	Efeito do PPX na neuroinflamação no modelo da EAE.....	94
3.4.5.	Efeito do PPX no sistema imune periférico.....	99
3.4.6.	Efeito do PPX na modulação redox dos animais induzidos com a EAE	101
3.4.7.	Efeito do PPX nas proteínas parkina e α -sinucleína dos animais induzidos com a EAE.....	104
3.4.1.	Efeito do tratamento agudo e repetido com PPX no comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS ..	107
3.4.1.	Efeito do tratamento repetido com PPX nos parâmetros relacionados à inflamação.....	111
3.4.1.	Estudo farmacológico da ação do PPX no comportamento tipo-depressivo.....	114
3.5.	Discussão	117
3.6.	Conclusões	127
	Referências	129
	ANEXO 1 – Revisão em revista não indexada	162
	ANEXO 2 – Artigo publicado no periódico Molecular Neurobiology	163
	ANEXO 3 - Artigo aceito para publicação.....	164
	ANEXO 4 - Menção honrosa XXXVIII Reunião Anual da SBNeC	165
	ANEXO 5 - Artigos produzidos em colaboração.....	166

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema imune

O sistema imune é constituído de vários tipos celulares, e pode ser dividido de modo geral em sistema imune inato e sistema imune adquirido ou adaptativo. O sistema imune inato é aquele responsável pela resposta imune imediata, constituído de células apresentadoras de antígenos (APC) e leucócitos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2012). Compreendem as APC os macrófagos, mastócitos, células dendríticas (CD) e micróglia, esta última fazendo a vigilância do sistema nervoso central (SNC), e são responsáveis por reconhecer micro-organismos, partículas e compostos químicos antigênicos, destruindo-os e apresentando-os às outras células do sistema imune (MEDZHITOV, 2008). Os leucócitos são células efetoras presentes na circulação sanguínea e que são atraídas para o local da infecção pelos mediadores químicos secretados pelas APC (ABBAS *et al.*, 2012). Já o sistema imune adaptativo é constituído de linfócitos, sendo responsável pela resposta tardia. Os linfócitos podem adquirir um fenótipo específico dependendo do estímulo que é dado, incluindo danos teciduais ou infecções (virais, bacterianas, parasitárias). Alguns dos fenótipos são as células T CD4+ (efetoras), células T CD8+ (citotóxicas), células NK (do inglês Natural Killer) e células B (memória imune) (ABBAS *et al.*, 2012; PENNOCK *et al.*, 2013). Os linfócitos T CD8+ são conhecidos como citotóxicos e têm a função de induzir a morte celular de células infectadas, já os linfócitos T CD4+ dão origem às células T auxiliares (Th, do inglês "T helper") (ABBAS *et al.*, 2012; PENNOCK *et al.*, 2013). Enquanto que os linfócitos T citotóxicos têm a função de eliminar micro-organismos através da liberação de grânulos citotóxicos no interior da célula infectada, as células Th liberam citocinas e quimiocinas, que medeiam a resposta imune. A ativação das células imune pode gerar processos inflamatórios. Até o momento seis subtipos de células Th já foram identificadas, Th1, Th2, Th9, Th17, Th folicular e T regulatória (Treg) (DONG, 2010; PENNOCK *et al.*, 2013). Cada subtipo desempenha uma função específica como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Funções das células T nos diferentes tipos de infecções e seus respectivos mediadores químicos. IL-x: interleucina, x = 1, 2, 6, etc; INF- γ : interferon gama; iNOS: óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*); TGF- β : Fator de crescimento transformador beta (do inglês, *transforming growth factor*); Th: células T auxiliares (do inglês, *T helper cells*); TNF- α : fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumoral necrosis factor alpha*); ERO: espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*). Fonte: Lieberknecht V. baseado no trabalho de (TRIPATHI e LAHESMAA, 2014)

Estímulo apresentado à célula T virgem	Mediadores químicos produzidos por APC	Célula T originada	Mediadores químicos produzidos pelas células T	Efeito
Bactéria intracelular, vírus e protozoários	IL-12 INF- γ	Th1	IL-2, INF- γ TNF- α	Aumento de: monócitos/ macrófagos iNOS ERO necrose É intracelular e microbicida
Bactérias extracelulares e fungos	TGF- β IL-6	Th17	IL-17a IL-17F IL-22	Aumento de: Polimorfonucleares ERO morte celular É extracelular e microbicida
Fatores intrínsecos ou	TGF- β	Treg	IL-10	Redução da inflamação e

convertidos			TGF- β 1 IL-35	tolerância imune
				Aumento de:
				Monócitos/ macrófagos
				Eosinófilos
Helmintos extracelulares, fungos e alergenicos	IL-25, IL-33	Th2	IL-4 IL-5 IL-13	Mastócitos Apoptose Eliminação de parasitas extracelulares e reparo de tecido danificado

Inflamação é um processo fundamental para manutenção da vida em diversas espécies (ABBAS *et al.*, 2012). Dentre suas funções, podemos citar o combate a microorganismos, corpos e compostos estranhos, conhecidos como antígenos, e regenerar tecidos danificados, evitando que os demais tecidos sejam prejudicados (MEDZHITOV, 2008). Os microorganismos, ao entrar em contato com os receptores do tipo -Toll e -NOD das APC, induzem a ativação destas (MEDZHITOV, 2008). Após sua ativação, as APC produzem mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, vasoaminas, eicosanoides e cascatas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008). Inicialmente, as APC produzem um exsudato inflamatório local, devido à liberação de mediadores vasoativos que aumentam a permeabilidade capilar, permitindo a entrada de proteínas plasmáticas e leucócitos (MEDZHITOV, 2008). Os leucócitos eliminam os microorganismos através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e cloroaminas (MEDZHITOV, 2008).

Caso a infecção perdure, os macrófagos e CD clivam as proteínas microbianas formando os epítomos e, ao expô-los na superfície celular, os apresentam aos linfócitos T virgens (ABBAS *et al.*, 2012). Além disso, as APC produzem mediadores químicos para atrair e ativar os linfócitos T (MASOPUST e

SCHENKEL, 2013). As APC podem não apenas atrair as células T, mas também migrar até os órgãos linfoides periféricos, chegando até os nódulos linfáticos onde encontrarão células T virgens. Ao se aproximarem dos linfócitos virgens, as APC apresentam os epítomos através do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês major “histocompatibility complex”), fazendo com que o epítomo entre em contato com o receptor de célula T (PENNOCK *et al.*, 2013). Os receptores de células T estão ligados à moléculas CD3, compostas pelas subunidades γ , δ , ϵ , e ζ , responsáveis pela ativação do sinal intracelular (PENNOCK *et al.*, 2013). Depois de ativadas, as células T produzirão mediadores químicos que ativam as células inflamatórias vizinhas, e recrutam células imunes distantes para o sítio da infecção ou injúria (ABBAS *et al.*, 2012; PENNOCK *et al.*, 2013).

Assim, o sistema imune desempenha um papel importante na prevenção de doenças infecciosas e ajuda no processo de recuperação de tecidos lesionados (ABBAS *et al.*, 2012). Porém, em casos de exacerbação dos sinais inflamatórios, e com consequente descontrole desses processos, o sistema imune pode colaborar com o surgimento de várias patologias como será discutido neste trabalho.

1.2. Inflamação periférica, neuroinflamação e doenças do sistema nervoso central (SNC)

Embora o sistema imune tenha importância fisiológica, ele também pode participar como agente causal de patologias (MEDZHITOV, 2008). Algumas patologias induzidas pelo sistema imune são: a) o choque séptico, onde há um desequilíbrio entre mecanismos pró- e anti-inflamatórios (LIU e MALIK, 2006); b) reações de hipersensibilidade do tipo I, como as alergias, onde há liberação de mediadores químicos de mastócitos. Esses mediadores são induzidos por moléculas que originalmente não seriam consideradas como antígenos; c) reações de hipersensibilidade do tipo II, como as anemias hemolíticas, nas quais há a produção de anticorpos que opsonizam as células do indivíduo; d) reações de hipersensibilidade do tipo III, como a artrite reumatoide, nas quais ocorre acúmulo de complexo antígeno-anticorpo e se depositam em vasos sanguíneos, articulações e glomérulos; e) reações de hipersensibilidade do

tipo IV ou autoimunes, como a esclerose múltipla, também conhecida por resposta tardia, nas quais uma célula apresentadora de antígeno apresenta aos linfócitos T um peptídeo do próprio organismo; f) reações de hipersensibilidade do tipo V, doença autoimune que apresenta mecanismo semelhante ao tipo II, porém ao invés dos anticorpos se ligarem aos antígenos de superfície, se ligam aos receptores celulares ativando-os ou inativando-os (RAJAN, 2003).

Neste trabalho será dada ênfase às doenças que afetam o SNC e que estão associadas a distúrbios do sistema imune, como por exemplo miastenia grave, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica e esclerose múltipla (EM) (GWATHMEY, BALOGUN e BURNS, 2014). Todas essas doenças autoimunes causam também a mielite transversa, que não é uma doença propriamente dita, mas uma condição inflamatória do SNC que causa morte neuronal (WEST, 2013). Além das doenças autoimunes citadas, a mielite transversa tem sido associada com doenças autoimunes não ligadas diretamente ao SNC (lúpus eritematoso sistêmico) (LI *et al.*, 2014) e infecções por vírus (citomegalovírus) (FUX *et al.*, 2003) e parasitas (*Schistosoma sp.*) (ROSS *et al.*, 2012). Além disso, moléculas produzidas e secretadas por células do sistema imune, com o objetivo de comunicação e sinalização, as chamadas citocinas, podem induzir alterações no comportamento humano e de outros animais. Estes achados sugerem que inflamações periféricas também podem induzir distúrbios neurológicos.

Além das doenças autoimunes, enfermidades neurodegenerativas como as doenças de Parkinson (DP) e de Alzheimer (AD, do inglês "Alzheimer's disease") também estão relacionadas a processos neuroinflamatórios (HONG, KIM e IM, 2016). Dentre os mecanismos inflamatórios já identificados encontram-se a ativação microglial, o aumento da liberação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e o interferon- γ (HONG *et al.*, 2016). É interessante ressaltar que alguns autores sugerem que nas fases iniciais da doença de Parkinson, a neuroinflamação possui aspectos benéficos e dificultaria a progressão da doença. Porém, com o passar do tempo, o agravamento dos processos inflamatórios aumentam a degeneração neuronal (HONG *et al.*, 2016). Tanto a DP quanto a AD são doenças que se desenvolvem, principalmente, em indivíduos idosos. Uma

característica marcante do cérebro idoso é o aumento natural de processos inflamatórios (MATT e JOHNSON, 2016). Ainda não está claro como acontece, mas já foi observado que no cérebro do idoso ocorre a perda da regulação de células microgлияis, que é feita por uma rede neuronal específica (MATT e JOHNSON, 2016).

Em termos fisiológicos, até o momento quatro vias de comunicação entre o sistema imune periférico e o SNC já foram estabelecidas: *a*) a difusão de citocinas, sem a participação de transportadores, do sangue para regiões encefálicas onde a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) é menor, como no plexo coroide, *b*) o transporte ativo de citocinas da periferia para o SNC através proteínas transportadoras saturáveis, as quais estão presente na BHE, *c*) ativação de receptores de citocinas em células endoteliais da BHE, que em sequência podem liberar citocinas ou segundos mensageiros diretamente no SNC, e *d*) a transmissão de sinais ativados por citocinas através de aferências nervosas, como por exemplo a do nervo vago (MATT e JOHNSON, 2016). A comunicação entre o sistema imune periférico e o SNC é ainda ilustrada pelos achados de que infecções periféricas, estão associadas as doenças neurodegenerativas (MAWANDA e WALLACE, 2013).

Interessantemente, a neuroinflamação também parece ser capaz de induzir o surgimento do transtorno depressivo maior (TDM) (MAES *et al.*, 2009). A TDM também tende a se manifestar nas doenças neurodegenerativas, como nas DP e AD (RÉUS *et al.*, 2016), bem como nas doenças autoimunes do sistema nervoso central, como a EM (MANNING, 2016). Além disso, em modelos animais de sepse leve, nos quais se administra periféricamente, e em baixas doses, o lipopolissacarídeo de membranas de bactérias gram negativas (LPS), comportamentos tipo-depressivo podem ser observados (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). O comportamento tipo-depressivo pode ser observado 24 h após a administração do LPS, enquanto que em períodos anteriores ocorre o “sickness behavior” ou comportamento tipo-doente. Estes comportamentos podem ser distinguíveis através da análise do número de cruzamento ou distância percorrida no teste do campo aberto (TCA). Enquanto os camundongos com comportamento tipo-doente tendem a fazer menos cruzamento ou caminhar por distâncias menores que os animais não desafiados, os

camundongos com comportamento tipo-depressivo não apresentam diferenças no TCA em comparação aos animais controle (FRENOIS *et al.*, 2007).

1.3. Esclerose Múltipla (EM)

O termo “esclerose” deriva da terminologia grega que significa cicatrização ou rigidez. No caso da EM, refere-se às áreas onde houve destruição da bainha de mielina no SNC. O termo “múltipla” refere-se à condição do número de vezes que se repete a esclerose (SOSPEDRA e MARTIN, 2005). A EM foi descrita pela primeira vez em 1869 por Jean-Martin Charcot como uma doença neurológica. Essa conclusão foi baseada no fato de que células inflamatórias foram encontradas acumuladas na região perivascular, dentro da substância branca do cérebro e da medula espinhal dos pacientes com disfunção neurológica (MCFARLAND e MARTIN, 2007). Passados 145 anos da sua descrição original, atualmente a EM é definida como uma doença inflamatória crônica autoimune, que induz neuroinflamação e desmielinização no SNC. Apresenta etiologia ainda indeterminada, com prevalência e incidência bastante variadas. A EM é ainda caracterizada pela destruição imunológica da bainha de mielina, perda de oligodendrócitos, gliose e lesão axonal induzidas, principalmente, por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e 17 (Th17) auto-reativos, sendo que as lesões aparecem como placas desmielinizadas na substância branca (AL-OMAISHI, BASHIR e GENDELMAN, 1999). A EM acomete, principalmente, indivíduos brancos, na faixa etária entre 20 e 40 anos, diferentemente das principais doenças neurodegenerativas que afetam pacientes idosos, tais como AD e DP (GLASS *et al.*, 2010), com forte predomínio sobre o sexo feminino, na proporção de 3:1, afetando aproximadamente 2,5 milhões de indivíduos em todo o mundo (LUBLIN e REINGOLD, 1996). A EM é a causa não traumática de incapacidade mais frequente no adulto jovem de países ocidentais. Desta forma, tem uma enorme relevância social, uma vez que interfere em vários aspectos da vida do paciente, incluindo as atividades profissional, familiar e social (LUBLIN e REINGOLD, 1996).

Clinicamente, a perda de mielina interfere na transmissão dos impulsos nervosos produzindo alguns sintomas comumente observados como, por exemplo, parestesias, ataxia, debilidade

dos membros, disfagia, neurite óptica, diplopia, espasticidade, nistagmo, vertigem, tremores, dor neuropática, disfunções sexuais, distúrbios esfinterianos e fadiga (HAFLER, 2004; KAWAKAMI *et al.*, 2005; GOVERMAN, 2009). Além disso, dados recentes demonstram que aproximadamente 65% dos pacientes com EM apresentam, além dos sintomas motores, considerável déficit cognitivo, os quais incluem perda de memória e déficit de atenção, quase sempre associados à TDM e ansiedade (ENGEL, GREIM e ZETTL, 2007). Especificamente, 40 a 65% dos pacientes com EM apresentam sintomas de TDM (TURNER *et al.*, 2016). Os indivíduos acometidos pela EM podem apresentar um ou mais dos quatro subtipos da doença, assim definidos: 1) síndrome clínica isolada (CIS, do inglês “clinical isolated syndrome”), a qual é caracterizada por sintomas clínicos relacionados à resposta desmielinizante, porém com diagnóstico não conclusivo para EM; 2) surto-remissão (RRMS, do inglês “relapsing remitting multiple sclerosis”), com surtos que são tipicamente causados pela EM, com ou sem sequelas e que atinge cerca de 80 a 85% dos pacientes; 3) progressiva-primária (PPMS, do inglês “primary progressive multiple sclerosis”), com incapacitação progressiva, acometendo cerca de 10 a 15% dos pacientes com EM; 4) progressiva secundária (SPMS, do inglês “secondary progressive multiple sclerosis”), com incapacitação progressiva após um surto inicial da doença, sendo que 90% dos pacientes com RRMS evoluem para SPMS (DUFFY, LEES e MOALEM-TAYLOR, 2014; LUBLIN, 2014).

As causas da EM são multifatoriais, possuindo fatores ambientais e intrínsecos ao paciente, apesar de haver controvérsia em relação aos fatores genéticos (PATRUCCO *et al.*, 2009; BRUM *et al.*, 2013; DO OLIVAL *et al.*, 2013; OUADGHIRI *et al.*, 2013). A incidência e a prevalência da EM estão diretamente relacionadas com a latitude, sendo que os países em latitudes mais elevadas possuem um maior número de casos, por exemplo, o Canadá (53° N) com cerca de 250 casos por 100.000 habitantes. O Brasil (25° S) é considerado um país de médio risco, com uma taxa de prevalência de 5 a 25 casos por 100.000 habitantes (WADE, 2014), sendo que os custos da doença ultrapassaram o valor de 122 milhões de dólares ou 245 milhões de reais, apenas no ano de 2009 (ROMANO *et al.*, 2013). Sugere-se que o efeito da latitude possa estar relacionado com níveis reduzidos de vitamina D. Essa vitamina possui efeitos

imunomodulatórios, regulando o sistema imune e prevenindo o reconhecimento de antígenos próprios (LUCAS *et al.*, 2015; SUNDSTROM e SALZER, 2015). Atualmente, a hipótese mais aceita da etiologia da doença está relacionada à infecção prévia por patógenos que, por possuírem proteínas semelhantes àsquelas da mielina, induzem uma resposta autoimune contra a bainha de mielina, processo esse definido como mimetismo molecular. Vírus como *Epstein-Barr*, *Varicella zoster* e *Rubeolla virus* ou bactérias como o *Mycobacterium avium paratuberculosis* possuem em suas proteínas, sequências polipeptídicas semelhantes àsquelas da proteína básica da mielina, as quais são, então, reconhecidas como antígenos pelas APC (DO OLIVAL *et al.*, 2013; MAMELI *et al.*, 2014).

Dentre as APC envolvidas na patogênese da EM, destacam-se as CD e os macrófagos perivasculares, sendo que essas células possuem papel importante no desenvolvimento da doença tanto em humanos quanto no modelo experimental de EM, que é denominado de encefalomielite autoimune experimental ou encefalomielite alérgica experimental (EAE). Após o reconhecimento de peptídeos pelas APC, essas migram para o tecido linfoide periférico e apresentam os antígenos aos linfócitos T virgens (Figura 1) (CHASTAIN *et al.*, 2011; KRUMBHOLZ *et al.*, 2012; GANGULY *et al.*, 2013). Então, estes linfócitos T se diferenciam em células Th1 - produtoras de interferon- γ (IFN- γ) e, principalmente, Th17 - produtoras de IL-17, IL-22 e IL-21 (MCFARLAND e MARTIN, 2007). A célula Th17 tem demonstrado alto potencial patogênico na EM, uma vez que possui expressão de marcadores de ativação, co-estimuladores e moléculas de adesão maior que as células Th1 (BRUCKLACHER-WALDERT *et al.*, 2009). Análises no sangue, líquido e tecido cerebral de pacientes com EM revelaram altos níveis de IL-17 em relação aos pacientes controle (BRUCKLACHER-WALDERT *et al.*, 2009). Essa citocina está associada à infiltração de células T e inflamação no parênquima cerebral (STROMNES *et al.*, 2008).

Durante a resposta neuroinflamatória na EM, os astrócitos também expressam MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias quando expostos ao INF- γ (NIKCEVICH *et al.*, 1997). Além disso, a concentração elevada de INF- γ no SNC induz a mudanças no fenótipo dos astrócitos, os quais passam a atuar como APC atípicas (Figura 1) (YANG *et al.*, 2012). No

SNC, as células T são reativadas pelas APC, principalmente, a micróglia, liberando radicais livres, citocinas e proteases que contribuem para a neuroinflamação, desmielinização e neurodegeneração axonal crônica (Figura 1) (COMABELLA e KHOURY, 2012). Esse processo contribui também para a degeneração Walleriana, na qual o axônio é separado do corpo neuronal (GOVERMAN, 2009).

Ainda nesse contexto, a morte de oligodendrócitos e neurônios são mediados, em parte, pela presença de ERO e ERN, as quais são produzidas, entre outros, em decorrência da liberação do glutamato por APC, microglia e linfócitos T auto-reativos (STEINMAN e ZAMVIL, 2003). O neurotransmissor glutamato ativa os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), contribuindo para o aumento do cálcio intracelular (Ca^{2+}). Este, por sua vez, induz a produção de ERO/ERN através de diferentes mecanismos, destaca-se aqui a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a depleção de ATP pelo aumento da ativação de proteínas trocadoras de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Esses trocadores são ativados na tentativa de manter a concentração intracelular de Ca^{2+} em níveis fisiológicos (NICHOLLS, 2004). Além disso, os níveis aumentados de IL-17 induzem o aumento na produção de ERO/ERN pelas células endoteliais e, conseqüentemente, ativa o sistema de contração dessas células e redução da molécula de junção paracelular ocludina, contribuindo para o aumento da permeabilidade da BHE (SIE *et al.*, 2014). Além das ERO, a permeabilidade da BHE também pode ser modulada pela produção de substância P, a partir das células endoteliais, em resposta as altas concentrações de TNF- α e INF- γ , mediadores que são produzidos pelas células T encefalitogênicas, especialmente, os linfócitos Th1 (NESSLER *et al.*, 2006). Por fim, a liberação de substância P ativa os receptores de neurocinina-1 expressos nas células endoteliais com conseqüente liberação de bradicinina (THORNTON *et al.*, 2010), a qual reduz a expressão da molécula de junção - claudina-5. Estas modificações contribuem para o aumento da permeabilidade da BHE, infiltração de novas células inflamatórias e propagação da resposta autoimune no SNC (Figura 1) (SIE *et al.*, 2014).

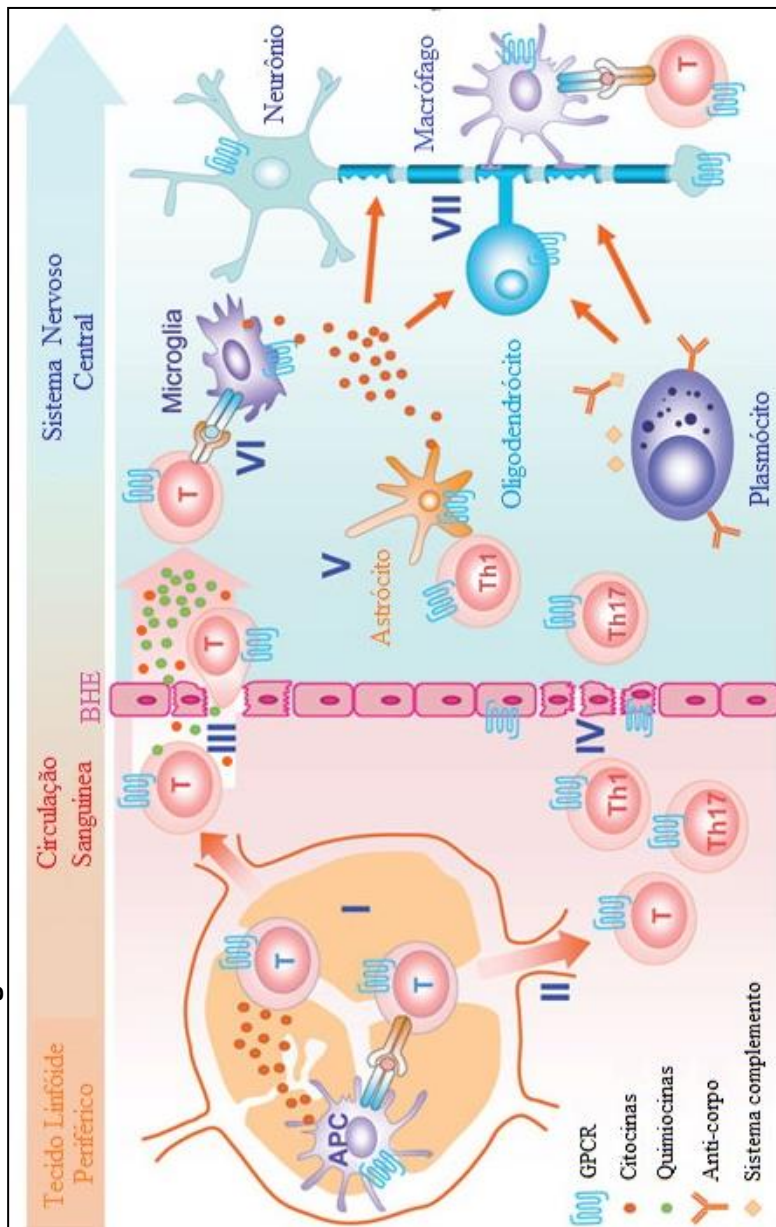
Até recentemente acreditava-se que após a ocorrência da ativação e proliferação de linfócitos T auto-reativos, estes migrariam através da circulação sanguínea até a região

subaracnóidea do SNC, atravessando-a nas regiões do plexo coroide e das vênulas meníngeas (locais onde a BHE é mais permeável) (GOVERMAN, 2009). Porém, um achado recente demonstrou a presença de vasos linfáticos no SNC, permeando os seios durais (LOUVEAU *et al.*, 2015). Essa descoberta sugere que os linfócitos T podem atingir ao SNC diretamente através do sistema linfático. Entretanto, medicamentos utilizados no tratamento da EM, que interagem com moléculas de adesão, como o natalizumab, reduzem a progressão da doença (ENGELHARDT e KAPPOS, 2008), sugerindo que a BHE possui um papel importante na proteção contra o desenvolvimento da EM.

Além dos linfócitos T CD4+ auto-reativos, as células T CD8+ também participam da patogênese da EM, considerando a presença de uma expansão clonal dessas células e sua persistência por anos no líquido (SKULINA *et al.*, 2004), como evidenciado em pacientes com EM. Além disso, as células T CD8+ também têm influência no aumento da permeabilidade vascular do SNC, aumentando a permeabilidade à células imunes (JOHNSON *et al.*, 2007).

A imunidade humoral também participa no desenvolvimento da EM, já que os pacientes portadores da doença apresentam: *i*) o número elevado de células B (QIN *et al.*, 1998), *ii*) uma produção intratecal persistente de imunoglobulinas (IgG) oligoclonais no líquido (QIN *et al.*, 1998) e *iii*) a participação direta dos linfócitos B no processo de desmielinização, através da produção de anticorpos específicos contra os oligodendrócitos, juntamente, com os diferentes mediadores inflamatórios presentes no ambiente neuroinflamatório (O'CONNOR *et al.*, 2005) (Figura 1).

Figura 1. Mecanismos moleculares envolvidos na EM.



I: ativação de células T nos órgãos linfóides periféricos, II: proliferação e diferenciação de células T, III: migração e infiltração de células inflamatórias da periferia para o SNC, IV: aumento da permeabilidade da BHE, V: ativação de astrócitos e VI: microglia, seguida de reativação dos linfócitos T encefalotóxicos dentro do SNC, VII: desmielinização e neurotoxicidade induzidas por linfócitos Th1 e Th17 auto-reativos, linfócitos CTL, linfócitos B, astrócitos e microglia ativadas. APC: célula apresentadora de antígeno, T: linfócito T, Th1: célula T helper 1, Th17: célula T helper 17, BHE: barreira hematoencefálica, GPCR: receptor acoplado à proteína G (Receptores de adenosina, adrenérgicos, canabinóides, de quimiocinas, dopaminérgicos e histaminérgicos), CTL: linfócito citotóxico CD8+. Figura adaptada de Du e Xie (2012).

Até 1817, pensava-se que a EM era uma variação da DP, mas a partir dessa data Jean-Martin Charcot identificou a EM como sendo uma patologia isolada. Entretanto, algumas similaridades moleculares entre a DP e a EM foram encontradas. Uma dessas semelhanças é o aumento de α -sinucleína (α -syn) nas lesões desmielinizadas e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM (PAPADOPOULOS *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012). A α -syn é uma proteína constituída de 140 resíduos de aminoácidos e expressa, mas não exclusivamente, nos terminais pré-sinápticos do sistema nervoso central (UEDA *et al.*, 1993). Ela pertence à família das sinucleínas, na qual além α -syn, também fazem parte a β - e γ -sinucleínas (CLAYTON e GEORGE, 1999). A α -syn ganhou destaque pela sua relação direta com a doença de Parkinson devido ao aumento em seus níveis e presença em inclusões intracelulares conhecidas como corpos de Lewy (CHENG, VIVACQUA e YU, 2011). Embora tenha sido amplamente associada com a DP, esta proteína possui papéis fisiológicos nas células neuronais. Dentre as funções da α -syn estão a regulação da transmissão sináptica e a reciclagem de vesículas sinápticas (CHENG *et al.*, 2011).

Ainda não está claro qual é o papel da α -syn na EM, uma vez que os estudos referentes aos níveis e função da α -syn ainda são conflitantes. Alguns autores observaram níveis aumentados da α -syn no SNC, tanto no encéfalo quanto no líquido de pacientes com EM e animais com EAE (PAPADOPOULOS *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012). Por outro lado,

Antonelou *et al.* (2015), mostrou níveis reduzidos dessa proteína no líquido cérebro-espinhal de pacientes com EM. Alguns trabalhos sugerem que a α -syn tenha um papel de induzir um aumento na atividade inflamatória na DP (GAO *et al.*, 2011). Porém, recentemente, foi demonstrado que a deficiência de α -syn aumentou a resposta imune mediada por células Th1 (ETTLE *et al.*, 2016).

Além da α -syn, também foram encontrados níveis aumentados de parkina nas lesões ativas do cérebro de pacientes com EM, o que foi demonstrado em um estudo *post-mortem*. Esse estudo mostrou que as células gliais co-expressam parkina e a proteína fibrilar glial ácida (GFAP, do inglês “glial fibrillary acid protein”), um marcador de células astrogliais (GEURTS *et al.*, 2007). A parkina, transcrita a partir do gene denominado PARK2, é uma enzima do tipo E3 ubiquitina ligase, cuja principal função no SNC é poli-ubiquitar proteínas, sinalizando, assim, para que estas sejam degradadas pelo sistema ubiquitina-proteasoma (WILHELMUS *et al.*, 2012; RILEY *et al.*, 2013). Entretanto, já foi demonstrada outra função independente da ubiquitinação, que é a de auxiliar na remoção de mitocôndrias danificadas (GEISLER *et al.*, 2010). Essas alterações foram relacionadas com o controle do dano oxidativo induzido pela resposta neuroinflamatória, que é uma resposta típica da EM. Em conjunto, esses dados sugerem que a parkina tem efeito celular protetor. Em concordância com esses achados, os déficits mitocondriais, classicamente associados a parkina, também foram encontrados durante a resposta autoimune e neuroinflamatória induzidas pela EM (MAHAD, LASSMANN e TURNBULL, 2008; CAMPBELL *et al.*, 2011). Assim, novos estudos são necessários para determinar as funções de α -syn e parkina na EM e na EAE. É possível que tanto a α -syn quanto a parkina possam vir a ser consideradas como marcadores inflamatórios na EM e na EAE.

Atualmente não existe cura para a EM, e dentre os medicamentos mais utilizados para o tratamento estão: *i)* altas doses de metilprednisolona, por vezes seguida de prednisolona; *ii)* os interferons (IFNs) β -1a (Avonex® e Rebif®) e o β -1b (Betaferon®), os quais são administrados através de injeções diárias (no entanto 30 a 50% dos pacientes não respondem a esta terapia); *iii)* o copolímero acetato de glatirâmer (GA), comercialmente conhecido como Copaxone® (TEVA

Neuroscience), constituído por uma mistura de polipeptídios sintéticos formados por quatro aminoácidos (L- ácido glutâmico, L-lisina, L-alanina e L-tirosina), que se assemelham à proteína básica de mielina, e tem demonstrado eficácia na prevenção e supressão da EAE (SCHREMPF e ZIEMSEN, 2007). Por fim, as terapias mais recentes, *iv*) os anticorpos monoclonais como o *natalizumab*, aprovado em 2004 para o tratamento da EM do tipo surto-remissão, o qual é um anticorpo monoclonal contra a molécula de adesão $\alpha 4$ -integrina (BOSCH *et al.*, 2011); ou *rituximab*, que é um anticorpo monoclonal quimérico contra a proteína de superfície celular CD20, encontrada primariamente em linfócitos B; e *v*) os novos medicamentos orais, como o *fingolimod (FTY720)*, foram aprovados pelo FDA em setembro de 2010, sendo o primeiro medicamento oral para o tratamento da EM do tipo surto-remissão, e mais recentemente (abril de 2013), o dimetil-fumarato foi aprovado por inibir a translocação do fator nuclear-kappa B (NF- κ B), assim como ativar o fator nuclear eritróide-2 (Nrf2). Como consequência deste tratamento, há inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e menor dano oxidativo (GRAHAM-ROWE, 2013). No entanto, todas essas terapias estão associadas a graves efeitos adversos ao organismo, conforme ilustrado na Tabela 2 (MAHDAVIAN *et al.*, 2010). Além disso, elas geram um custo alarmante para o Sistema Único de Saúde (SUS), na faixa de R\$ 60 a 120 mil/ano/paciente. Ainda, o recente Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla do Ministério da Saúde publicada em dezembro de 2014 (Portaria SAS/EM nº 1.505 - 29/12/2014), preconiza o uso de INF- β e glatirâmer como medicamentos de primeira escolha para EM. Recomenda-se que o *natalizumab* e/ou *fingolimod* seja iniciado somente em casos refratários ao INF- β ou glatirâmer, gerando desta forma um custo mensal por paciente que varia de R\$ 2.300,00 a R\$ 7.800,00, respectivamente. Além disso, o tratamento medicamentoso geralmente está associado a outros tratamentos de suporte, como a fisioterapia, a psicoterapia, a fonoaudiologia, a terapia ocupacional. Estes tratamentos complementares visam a manutenção da qualidade de vida do paciente, principalmente nos pacientes com sequelas incapacitantes (CALLEGARO *et al.*, 2002). Assim, a descoberta de novos compostos imunomoduladores, tratamentos e/ou alvos terapêuticos é

necessária para o desenvolvimento de terapias mais eficazes, com menores custos e menos efeitos adversos.

Tabela 2. Efeitos adversos e estratégias terapêuticas dos fármacos utilizados no tratamento da EM. Tabela baseada no trabalho de Mahdavian e colaboradores (MAHDAVIAN et al., 2010).

Composto	Eventos adversos	Avaliação e estratégias de gerenciamento
INF- β	Reações no sítio de administração	Titulação da dose, métodos tópicos (p.e. gelo); auto-limitado.
	Aumento nas enzimas indicativas de dano hepático	Revisão de outros medicamentos hepatotóxicos, consideração de suspensão do INF- β ou tratamento com dose mais baixa.
	Leucopenia	Redução da dose, descontinuidade da medicação ou tratamento com dose mais baixa.
	Depressão	Considerar avaliação psiquiátrica e terapia antidepressiva; se severa, considerar descontinuação da medicação.
Copaxone	Reações no sítio de administração	Métodos tópicos. Nenhum – geralmente autolimitado.

Reações sistêmicas
benignas (dispneia e
palpitações)

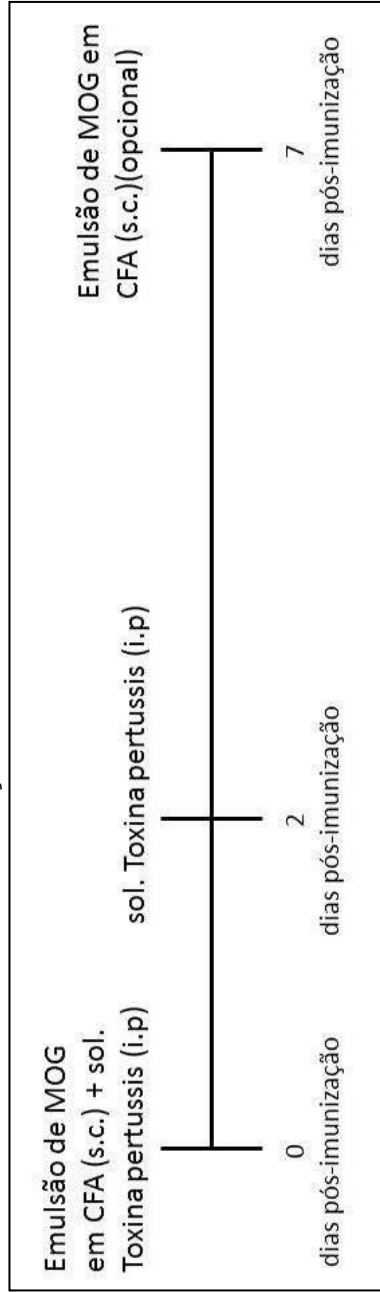
Fingolimode	Bradiarritmia	<p>Protocolo de administração de primeira dose (monitoramento da frequência cardíaca e pressão sanguínea por 6h).</p> <p>Consulta com cardiologista em caso de fatores de risco ou eletrocardiograma anormal.</p>
	Edema macular	<p>Monitoramento cardíaco em caso de fatores de risco ou a ocorrência de eventos durante a observação de primeira dose.</p> <p>Monitoramento oftalmológico; considerar indefinidamente em pacientes diabéticos ou com histórico de uveíte.</p>
	Infecções por <i>Herpes</i> virus	<p>Terapia antiviral; considerar profilaxia em pacientes com recorrência</p>
Teriflunomida	Risco teratogênico	<p>Enfatizar para uma contracepção confiável; se ocorrer gravidez durante o uso ou em caso de planejamento após o uso, utilizar protocolo de aceleração da eliminação</p>

		do medicamento
	Hepatotoxicidade	Monitoramento mensal de função hepática, por 6 meses, descontinuidade do medicamento e uso do protocolo de aceleração de eliminação do composto em caso de toxicidade moderada.
	Ruborização da face (relação com a dose)	Auto-limitado; pode ocorrer com alimentos ou aspirina.
Dimetil fumarato (BG-12)	Sintomas adversos gastrointestinais	Auto-limitado; sintomático.
	Leucopenia	Monitoramento laboratorial.
Alemtuzumab	Auto-imunidade secundária	Monitoramento laboratorial.

Diversos modelos animais de EM são utilizados para o estudo de novos alvos moleculares, dentre os quais se destacam: *i)* a encefalomielite induzida pela administração de cuprizona, um agente quelante de cobre; *ii)* camundongos com mutação para as proteínas de mielina; e *iii)* a encefalomielite autoimune (alérgica) experimental, sendo esse o modelo mais utilizado pela facilidade de implementação, segurança e reprodutibilidade superiores. A EAE surgiu como modelo da EM em 1925 através da observação de que coelhos imunizados com homogenato de medula espinal humana apresentaram inflamação no SNC, com posterior paralisia. Atualmente, a indução da EAE pode ser realizada de duas maneiras distintas: ativa (Figura 2) ou passiva. Para a imunização ativa, utiliza-se peptídeos ou proteína de mielina, tais como fragmentos da proteína básica de mielina (PBM), da proteolipoproteína (PPL) ou glicoproteína de mielina oligodendroglial (MOG). Esses peptídeos

devem ser administrados juntamente com o adjuvante completo de Freund (CFA), que é responsável por sensibilizar o sistema imune (STROMNES e GOVERMAN, 2006a). Os animais recebem ainda uma injeção i.p. de uma solução contendo *toxina Pertussis* em PBS nos dias 0 e 2 pós-imunização (p.i.). Uma segunda imunização pode ser realizada sete dias após a primeira administração a fim de aumentar as chances de sucesso da EAE (STROMNES e GOVERMAN, 2006a), conforme ilustrado na Figura 2. Em contrapartida, a imunização passiva ocorre pela transferência de células T CD4+ previamente reativas aos antígenos de mielina (STROMNES e GOVERMAN, 2006b), sempre realizada em linhagens de animais naïve susceptíveis, tal como o camundongo C57BL/6.

Figura 2. Representação esquemática dos procedimentos envolvidos com a indução da EAE ativa em roedores.



A EAE é induzida com inoculação de 100 μ L de emulsão contendo 200 μ g de glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG₃₅₋₅₅), em adjuvante incompleto de Freund (CFA), suplementado com 300 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*) H37Ra (Difco, Detroit, MI, USA), em ambos os flancos traseiros. Além disso, cada animal recebe 300 ng de *Bordetella* toxina *Pertussis* em 200 μ L de solução salina por via intraperitoneal no dia 0 e no dia 2 pós-imunização. Os animais são pesados e examinados diariamente, durante 40 dias (STROMNES e GOVERMAN, 2006). Fonte da figura: o autor.

Após a indução da EAE, os animais podem apresentar diferentes cursos clínicos, tais como: *i*) **clássico**, o qual se manifesta clinicamente como uma paralisia flácida ascendente da cauda, progredindo para as patas traseiras e, posteriormente, para as dianteiras (Tabela 3), com a presença de lesões desmielinizantes na medula espinhal ou *ii*) **atípico**, o qual apresenta sintomas motores, sensoriais e cognitivos do tipo surto-remissão, com lesões em regiões supra-espinhais (KERLERO DE ROSBO *et al.*, 1995; STROMNES e GOVERMAN, 2006a). Dentro desse contexto, observa-se que a PLP₁₃₉₋₁₅₁ em camundongos SJL/J; o MBP_{Ac1-11} em camundongos PL/J; e o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6 induzem manifestação cínica clássica da EAE (STROMNES e GOVERMAN, 2006a). Por outro lado, a EAE atípica pode ser obtida pela administração do MOG₃₅₋₅₅ em camundongos PL/J, com início dos sintomas somente após o 50º dia pós-imunização, enquanto que nos animais C57BL/6 os sintomas iniciam-se entre o 10º e 20º dia pós-imunização (KERLERO DE ROSBO *et al.*, 1995). Outros fatores que influenciam no desenvolvimento da EAE são a idade e o sexo dos animais, com maior incidência em fêmeas jovens - 6 a 10 semanas de idade (STROMNES e GOVERMAN, 2006a).

Tabela 3. Escore clínico da EAE (STROMNES e GOVERMAN, 2006a).

Escore	Sinais clínicos	Observações
0	Sem sinais	Os animais ficam com as patas posteriores estendidas; a cauda enrola no objeto cilíndrico; andar normal.
0,5	Perda parcial do tônus da cauda	Os animais ficam com as patas posteriores estendidas; ponta da cauda caída e/ou não enrola no objeto cilíndrico; andar normal.
1	Perda total do tônus da cauda	Os animais ficam com as patas estendidas; cauda caída e não enrola no objeto cilíndrico; andar

			normal.
2	Perda na coordenação dos movimentos, paresia das patas posteriores		Os animais contraem as patas posteriores quando são seguros pela cauda; os animais caminham com falta de coordenação nos movimentos; os animais apresentam reflexo nas patas quando apertadas; cauda sem tônus.
2,5	Uma das patas posteriores paralisadas		Os animais arrastam uma das patas; uma das patas não responde ao reflexo.
3	Ambas as patas posteriores paralisadas		Ambas as patas posteriores paralisadas; os animais arrastam ambas as patas posteriores e ambas não respondem ao reflexo.
3,5	Fraqueza nas patas anteriores		Patas posteriores arrastadas; patas dianteiras com dificuldades de mover o corpo; ambas as patas não respondem ao reflexo.
4	Paralisia das patas anteriores		Os animais não se movem; as patas posteriores e anteriores não respondem ao reflexo.
5	Moribundo/morte		Morte. Nenhum movimento; frio ao toque, respiração alterada. Animais são eutanasiados.

Além das alterações motoras, também é possível observar durante o desenvolvimento da EAE, comportamentos característicos de outras neuropatias como hiperalgesia, alodinia e comportamento tipo-depressivo (DUTRA *et al.*, 2013; GENTILE *et al.*, 2015; MAJIDI-ZOLBANIN *et al.*, 2015). Esses sintomas são observados de forma semelhante em humanos (TURNER *et al.*, 2016), o que aumenta ainda mais a confiabilidade do modelo.

1.4. Depressão

A perda do bem-estar e a incapacitação sofrida pelos pacientes com TDM possui impacto direto na economia devido a diminuição na produtividade dos indivíduos afetados e a maior utilização dos serviços de saúde pública (GREENBERG *et al.*, 2003). Dentre as principais questões econômicas relacionadas ao TDM estão os altos custos devido a frequente cronicidade, podendo haver recorrência, assim como o suicídio, que é associado a surtos psicóticos (BRANCHI *et al.*, 2013; HUNTER *et al.*, 2014). Os custos relacionados ao TDM, na economia norte americana, no ano 2000, foram estimados em 83,1 bilhões de dólares. Deste total, U\$ 26,1 bilhões foram em gastos diretos com cuidados médicos, U\$ 5,4 bilhões em custos relacionados à morte por suicídio e U\$ 51,5 bilhões em custos indiretos por faltas ou incapacidade no trabalho (GREENBERG *et al.*, 2003). Embora os dados epidemiológicos no Brasil sejam escassos, é sugerido que os custos do tratamento do TDM seja de cerca de 5.500,00 reais por paciente por ano (LEPINE *et al.*, 2012). Há previsão de que até o ano de 2020, o TDM será a segunda maior causa de incapacitação de pessoas por ano, no mundo (CHING-LOPEZ *et al.*, 2015). Em 2030 o TDM poderá se tornar a principal doença a causar maior perda de tempo de vida por debilidade ou morte. Atualmente, estima-se que de 17 a 21 % da população mundial desenvolverá, ao menos, um episódio depressivo durante a sua vida (SCHECHTER *et al.*, 2005; ASCHBACHER *et al.*, 2012). Ainda, a epidemiologia do TDM demonstra que as mulheres são mais afetadas do que homens em uma proporção de 2:1 (KESSLER, 2003).

O TDM era conhecido como melancolia, do grego “melas”, preto, e “kholé”, bile, ou seja, bile negra. Os gregos acreditavam que o *humor*, bile negra, tido como um dos quatro fluidos básicos do corpo (os outros três eram: sangue, fleuma e bile amarela) que determinavam a personalidade das pessoas e que um desequilíbrio entre estes quatro tipos de fluidos gerava a melancolia (WONG e LICINIO, 2001). Desta forma, a melancolia era um desequilíbrio no fluido biliar e foi definida por Hipócrates como “uma afecção sem febre, na qual, sem razão, o espírito triste permanece sem razão, fixado em uma mesma ideia, constantemente abatido...”. O termo melancolia foi usado até o século 19, mas acabou por se tornar referência a uma patologia

e mais tardiamente a um temperamento. O termo depressão foi usado inicialmente por Louis Delasiuave em 1856, tendo sido derivado da palavra latina deprimere que significa pressão, aparecendo a partir de 1860 em dicionários médicos e se referindo metaforicamente e fisiologicamente como perturbações no estado de humor (BERRIOS, 1988).

Nos episódios depressivos diversos sintomas, descritos na Tabela 4, podem ser observados. Entretanto, como preconizado no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM 5 - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, 2014), para que um paciente receba o diagnóstico são necessários cinco ou mais sintomas e que ao menos um deles seja humor deprimido ou anedonia.

Tabela 4. Diagnóstico da TDM. Fonte: DSM-5, 2014.

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO

Cinco (ou mais) dos seguintes sintomas estiveram presentes durante o mesmo período de duas

semanas e representam uma mudança em relação ao funcionamento anterior; pelo menos um

dos sintomas é (1) humor deprimido ou (2) perda de interesse ou prazer.

Nota: Não incluir sintomas nitidamente devidos a outra condição médica.

1. Humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias, conforme indicado por relato

subjetivo (p. ex., sente-se triste, vazio, sem esperança) ou por observação feita por outras

pessoas (p. ex., parece choroso). (**Nota:** Em crianças e adolescentes, pode ser humor irritável.)

2. Acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades na

maior parte do dia, quase todos os dias (indicada por relato subjetivo ou observação feita por

outras pessoas).

3. Perda ou ganho significativo de peso sem estar fazendo dieta (p.

ex., uma alteração de mais

de 5% do peso corporal em um mês), ou redução ou aumento do apetite quase todos os

dias. (**Nota:** Em crianças, considerar o insucesso em obter o ganho de peso esperado.)

4. Insônia ou hipersonia quase todos os dias.

5. Agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias (observáveis por outras pessoas, não meramente sensações subjetivas de inquietação ou de estar mais lento).

6. Fadiga ou perda de energia quase todos os dias.

7. Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada (que podem ser delirantes)

quase todos os dias (não meramente autorrecriinação ou culpa por estar doente).

8. Capacidade diminuída para pensar ou se concentrar, ou indecisão, quase todos os dias (por

relato subjetivo ou observação feita por outras pessoas).

9. Pensamentos recorrentes de morte (não somente medo de morrer), ideação suicida recorrente

sem um plano específico, uma tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio.

B. Os sintomas causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social,

profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo.

C. O episódio não é atribuível aos efeitos fisiológicos de uma substância ou a outra condição médica.

D. A ocorrência do episódio depressivo maior não é mais bem explicada por transtorno esquizoafetivo,

esquizofrenia, transtorno esquizofreniforme, transtorno delirante, outro transtorno do espectro

da esquizofrenia e outro transtorno psicótico especificado ou

transtorno da esquizofrenia

e outro transtorno psicótico não especificado.

E. Nunca houve um episódio maníaco ou um episódio hipomaníaco.

Nota: Os Critérios A-C representam um episódio depressivo maior.

Nota: Respostas a uma perda significativa (p. ex., luto, ruína financeira, perdas por um desastre natural, uma doença médica grave ou incapacidade) podem incluir os sentimentos de tristeza intensos, ruminação acerca da perda, insônia, falta de apetite e perda de peso observados no Critério A, que podem se assemelhar a um episódio depressivo. Embora tais sintomas possam ser entendidos ou considerados apropriados à perda, a presença de um episódio depressivo maior, além da resposta normal a uma perda significativa, também deve ser cuidadosamente considerada. Essa decisão requer inevitavelmente o exercício do julgamento clínico baseado na história do indivíduo e nas normas culturais para a expressão de sofrimento no contexto de uma perda.*

Nota: Essa exclusão não se aplica se todos os episódios do tipo maníaco ou do tipo hipomaníaco são induzidos por substância ou são atribuíveis aos efeitos psicológicos de outra condição médica.

Embora a etiologia da doença não esteja estabelecida, sabe-se que diversos fatores genéticos e ambientais contribuem para o desenvolvimento do TDM, dentre eles alterações genéticas e ambientais. Ambos os fatores desencadeiam desequilíbrios bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, tornando possível afirmar que a etiologia é multifatorial (GOLDBERG, 2006). Além disso, este transtorno psiquiátrico está frequentemente associado à outras doenças, ou seja, apresenta alto índice de comorbidade. Algumas doenças parecem ter sua piora induzida com o aparecimento do TDM, como as doenças cardiovasculares, neurológicas e câncer (HALARIS, 2009; MEHNERT *et al.*, 2014; TAO e WANG, 2016). Além disso, há uma alta taxa de comorbidade entre o TDM e transtornos de ansiedade, estimada entre 60 e 90 % (DEVANE *et al.*, 2005).

Tabela 5. Antidepressivos utilizados no tratamento da TDM e seus efeitos adversos. 5-HT = serotonina; dopamina = dopamina; MAO-A/B = monoaminas oxidase A/B; NA = noradrenalina. Fonte: o autor.

Classificação	Antidepressivo	Principal mecanismo de ação	Efeitos Colaterais	Referências
Inibidores da MAO A/B	Tranilcipromi-na Clorgilina Moclobemida	Inibem as enzimas MAO A e B envolvidas na degradação das monoaminas, aumentando os níveis das monoaminas na fenda sináptica.	Sedação Confusão Perda da coordenação motora precisa Tremores Excitação Convulsões Ganho de peso Hipotensão postural Boca seca Obstipação Retenção urinária	(MCKERNAN, DINAN e CRYAN, 2009; GOODMAN <i>et al.</i> , 2011)
Antidepressivos tricíclicos	Clomiprami-na Imipramina Amitriptilina Nortriptilina	Bloqueiam os transportadores NA e 5-HT, aumentando os níveis de 5-HT e NA na fenda sináptica	Ganho de peso Sonolência Constipação Boca seca Diminuição da acuidade visual Tontura Hipotensão Estimulação do apetite	(PEIXOTO <i>et al.</i> , 2008; GOODMAN <i>et al.</i> , 2011)

Inibidores seletivos da recaptação de serotonina	Floxetina Sertralina Paroxetina Citalopram	Bloqueiam os transportadores 5-HT, aumentando os níveis de 5-HT na fenda sináptica	Ansiedade Alterações nos movimentos motores Apatia Náuseas Vômitos Aumento da motilidade intestinal Cólicas e diarreias Estimulação do apetite Diminuição do peso Anorexia	(PEIXOTO <i>et al.</i> , 2008; GOODMAN <i>et al.</i> , 2011)
Antidepressivos de nova geração	Mirtazapina Venlafaxina Trazodona Milnaciprano Bupropiona Duloxetina	Mecanismo de ação variado, normalmente agindo através do agonismo ou antagonismo de receptores de 5-HT, de NA, de dopamina e de histamina.	Disfunção sexual Ganho de peso Sonolência Hipotensão postural Estimulação do apetite Perda de peso devido a anorexia Fraqueza ou fadiga Taquicardia Constipação Obs. Efeitos adversos que variam com o fármaco	(PEIXOTO <i>et al.</i> , 2008; GOODMAN <i>et al.</i> , 2011)

O tratamento do TDM pode envolver fármacos antidepressivos os quais possuem diferentes modos de ação (Tabela 5). Embora os antidepressivos sejam capazes de atuar sobre os sintomas do TDM, apenas um terço dos pacientes atingem a remissão completa dos sintomas (AL-HARBI, 2012). Ainda, 10 a 30 % dos pacientes não respondem a nenhum tipo de tratamento e em 70% dos indivíduos, a primeira escolha de antidepressivo não possui efeito sobre os sintomas do TDM (AL-HARBI, 2012). Além disso, é comum os pacientes apresentarem efeitos adversos, como os descritos na tabela 5, que influenciam seu cotidiano; dificultando a adesão ao tratamento.

Desta forma, dentre os fármacos utilizados para tratar o TDM podemos citar os inibidores da monoamina oxidase (MAO) e os inibidores da recaptação de monoaminas (serotonina, norepinefrina, e dopamina). Os inibidores da recaptação de monoaminas podem ser seletivos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, noradrenalina, ou não seletivos como os antidepressivos tricíclicos. Há também os antidepressivos ditos atípicos, cujo mecanismo de ação não se encaixa em nenhuma das descrições anteriores (HOLTZHEIMER e NEMEROFF, 2006). Os inibidores não-seletivos das MAO, ou seletivos para MAO-B, se originaram a partir de medicamentos desenvolvidos para tratar a tuberculose. Durante o tratamento destes pacientes observou-se uma melhora no humor (MASSART, MONGEAU e LANFUMEY, 2012). A partir da observação dos efeitos dos antidepressivos sobre os níveis das monoaminas surgiu a hipótese monoaminérgica, postulando que uma redução nos níveis de serotonina, dopamina e noradrenalina seria a principal causa do TDM (SCHILDKRAUT, 1965). Entretanto, outros estudos questionaram essa hipótese, sugerindo que a diminuição de monoaminas seja um epifenômeno (DUMAN e LI, 2012; MASSART *et al.*, 2012).

Vários estudos têm demonstrado uma redução de volume do hipocampo e córtex pré-frontal de pacientes diagnosticados com TDM (DREVETS, PRICE e FUREY, 2008; MACQUEEN *et al.*, 2008). Estudos *post-mortem* (MIGUEL-HIDALGO e RAJKOWSKA, 2002; DREVETS *et al.*, 2008) e pré-clínicos (DUMAN e MONTEGGIA, 2006) mostraram que neurônios e células gliais são afetadas nessas regiões. Ressalta-se que esses estudos demonstraram que o estresse parece ter um papel crítico no desenvolvimento do TDM (DUMAN e MONTEGGIA,

2006; KRISHNAN e NESTLER, 2008). A atrofia cerebral, conforme observado em estudos *post-mortem* e em modelos animais, sugere um papel para a redução de neurotrofinas. A sobrevivência de células neuronais depende de moléculas que ativam receptores específicos, os quais ativam mecanismos de sobrevivência e proteção celular (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; KRISHNAN e NESTLER, 2008; CASTREN e RANTAMAKI, 2010). Em modelos de depressão e de estresse crônico, diversas neurotrofinas estão diminuídas. Entre elas estão o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain derived neurotrophic factor*), fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento do nervo ou neural e neurotrofina-3 (MAO *et al.*, 2010a; MAO *et al.*, 2010b). Além disso, os níveis de BDNF estão reduzidos no soro de pacientes com TDM e o tratamento com antidepressivos induziu ao aumento desta neurotrofina (SEN, DUMAN e SANACORA, 2008; BOCCHIO-CHIAVETTO *et al.*, 2010). Estes achados deram origem à hipótese neurotrófica da depressão (DUMAN e LI, 2012). Até o momento, o BDNF é a neurotrofina mais estudada na depressão (BJORKHOLM e MONTEGGIA, 2015). As alterações neurotróficas parecem ser região-específicas, sendo encontradas principalmente em regiões relacionadas com o eixo hipotálamo-hipofisário (HPA, do inglês *hypothalamic-pituitary axis*) (STEPANICHEV *et al.*, 2014).

Atualmente, tem sido aceita a hipótese de que a desregulação do eixo HPA seja uma das causas da depressão. Níveis elevados de cortisol e corticosterona, chamados hormônios glicocorticóides, são frequentemente encontrados no soro de pacientes e de animais submetidos a modelos animais de depressão, respectivamente (VREEBURG *et al.*, 2009; GONG *et al.*, 2015; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2015). Devido à lipofilicidade dos hormônios glicocorticóides, estes atravessam a barreira hematoencefálica e ligam-se aos receptores glicocorticóides no interior da célula (VIELKIND *et al.*, 1990). Embora a ativação dos receptores glicocorticóides, ou receptor corticoide do tipo II, não induza diretamente a morte celular, a ativação contínua induz susceptibilidade a insultos neurotóxicos (CONRAD, 2008). A ativação prolongada dos receptores de glicocorticóides causa retração das espinhas dendríticas, reduzindo a comunicação entre neurônios e a liberação de neurotrofinas (CONRAD, 2008).

Diversos modelos animais foram desenvolvidos para investigar a possível etiologia do TDM e induzem comportamentos tipo-depressivo. Esses comportamentos são observados em testes desenvolvidos para avaliar a possível eficácia de compostos na depressão. Dentre os modelos animais desenvolvidos podemos citar: a) o estresse crônico imprevisível, no qual o animal é submetido a diferentes situações estressantes durante duas ou mais semanas (WILLNER *et al.*, 1987); b) modelo da derrota social, no qual um camundongo é colocado em presença do macho dominante 5 min por dia durante duas semanas (KUDRYAVTSEVA, BAKSHTANOVSKAYA e KORYAKINA, 1991); c) estresse de retenção, no qual o animal fica retido em um recipiente de modo a restringir por completo seus movimentos (YANO, AKAHANE e HARADA, 1977); d) administração repetida de corticosterona, que mimetiza a disfunção do eixo HPA (INOUE e KOYAMA, 1996); e e) administração de ativadores da inflamação como LPS, que induzem eventos neurinflatórios (YIRMIYA, 1996). Como previamente descrito neste capítulo, além da redução de neurotransmissores na fenda sináptica diversas alterações já foram observadas no cérebro de pacientes e em modelos animais de depressão. Entretanto, a maior parte dos antidepressivos utilizados na clínica visa aumentar a quantidade de neurotransmissores, tais como serotonina, dopamina e noradrenalina, ou potencializar a sua ação, como mostrado na Tabela 5 (LEISTEDT e LINKOWSKI, 2013).

Os modelos de depressão induzem comportamento tipo-depressivo. Esse comportamento é mensurado pelo tempo que os animais permanecem imóveis nos testes do nado forçado (TNF, do inglês “forced swimming test”) desenvolvido por Porsolt e colegas em 1977, e no teste de suspensão pela cauda (STERU *et al.*, 1985). Outros parâmetros também podem ser analisados nos modelos de depressão, como a anedonia. Um dos testes que avalia a perda do prazer é a preferência pela sacarose, no qual é avaliada a quantidade de solução de sacarose que é consumida. Os animais que possuem comportamento tipo-depressivo consomem menos solução de sacarose do que os animais controle, que não foram submetidos aos procedimentos de indução do comportamento tipo-depressivo (MUSCAT, PAPP e WILLNER, 1992). A anedonia também pode ser avaliada no *splash test*, o qual consiste em borrifar uma solução de 10% de

sacarose no dorso do animal e cronometrar o tempo de autolimpeza (DUCOTTET e BELZUNG, 2004). Além disso, o *splash test* também permite avaliar a motivação através da medida do tempo de latência para iniciar a autolimpeza (D'AUDIFFRET *et al.*, 2010). Neste teste os animais que apresentam um comportamento tipo-depressivo possuem uma latência maior para iniciar a autolimpeza (“grooming”). Assim, é possível identificar se compostos novos tem potencial de estudos clínicos para depressão.

1.4.1. Inflamação, neuroinflamação e TDM

A primeira evidência de que mecanismos inflamatórios estariam associados ao TDM surgiu em 1991. A ideia de que o sistema imune poderia estar relacionado com doenças mentais veio da observação de que citocinas como o interferon- α , - β , e - γ (INF- α , - β e - γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas 1 e 2 (IL-1 e -2) podem chegar ao SNC. As citocinas atravessam a barreira hemato-encefálica, chegando a várias regiões do cérebro, incluindo o hipotálamo (SMITH, 1991). Foi observado que a IL-1 induz alterações no sono (SMITH, 1991; SCHMIDT *et al.*, 2015), na memória (SCHMIDT *et al.*, 2015), na percepção da dor (SMITH, 1991), e provoca a liberação de hormônios hipofisários (SMITH, 1991; SCHMIDT *et al.*, 2015; QADRI *et al.*, 2016). A IL-1 também é capaz de regular fatores de crescimento (SMITH, 1991; HO e BLUM, 1997), temperatura corporal (FURUZAWA *et al.*, 2002) e modular fome e locomoção (SMITH, 1991; FURUZAWA *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2014). Smith *et al.* (1991) observaram, ainda, que a administração de citocinas em pacientes com câncer tinha efeitos na cognição e no comportamento. Altas doses de IL-2 induziram alterações cognitivas e comportamentais graves, incluindo delirium, desorientação, ilusão, paranoia, irritabilidade, incoerência, perda de memória, incapacidade de concentração, depressão, agitação, fadiga severa, anorexia e mal-estar. O aumento no receptor de IL-2, bem como de TNF- α e IL-6, também foi observado no sangue periférico de pacientes com TDM, sendo estas citocinas correlacionadas com o aparecimento de sintomas não-motores (fadiga, transtornos de humor, alterações no sono, ansiedade e outros) (LINDQVIST *et al.*, 2012).

Os interferons, que são produzidos por células inflamatórias, também foram utilizados para tratar pacientes com câncer. Esse tratamento afeta o SNC, levando ao aparecimento de sintomas, como fadiga, letargia ou confusão mental (SMITH, 1991). Os estudos com IL-2 e interferons forneceram evidências iniciais, claras e convincentes de que o sistema imune possui uma forte ação sobre o sistema nervoso central. Além disso, pessoas que são infectadas por vírus ou bactérias apresentam sintomas de mal-estar, fadiga, depressão, isolamento, falta de motivação, apetite reduzido e letargia (MILLER e RAISON, 2016).

Apenas um ano após as observações de Smith, Maes e colaboradores (1992) demonstraram uma razão de linfócitos Th/Treg maior em pacientes depressivos do que aquela observada em pacientes controle. Esses dados sugeriram que durante o TDM ocorre ativação do sistema imune que poderia estar relacionado com o aparecimento dos sintomas (MAES *et al.*, 1992). Além disso, pacientes que desenvolvem doenças, nas quais há neuroinflamação, também tendem a desenvolver sintomas depressivos. Isso é observado na DP, AD, EM e traumatismo crânioencefálico (BRITES e FERNANDES, 2015; YIRMIYA, RIMMERMAN e RESHEF, 2015; MOGHADASI *et al.*, 2016). Ainda, uma história de sepse é um fator de risco para doenças neurológicas, incluindo doenças neurodegenerativas e sintomas depressivos (SANKOWSKI, MADER e VALDE-FERRER, 2015). Esse efeito também é observado em modelos animais de sepse (COMIM *et al.*, 2010) ou por injeção intraperitoneal do LPS (BRUSTOLIM *et al.*, 2006; MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). O papel da sepse no desenvolvimento de transtornos neurológicos parece estar relacionado com a presença de vasos linfáticos no SNC, que permeiam os seios durais (LOUVEAU *et al.*, 2015). Caso seja confirmado (LOUVEAU *et al.*, 2015), há possibilidade de que a passagem de células imunes e citocinas, chegando ao SNC, seja muito maior do que se conhece hoje.

Um modelo que tem sido utilizado para induzir neuroinflamação e comportamento tipo-depressivo em camundongos é a administração intraperitoneal de LPS em doses muito menores do que aquelas necessárias para induzir sepse (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013; SULAKHIYA *et al.*, 2016). Em roedores, vários mecanismos de indução de

comportamento tipo-depressivo pelo LPS já foram sugeridos. O primeiro evento associado com alterações do comportamento induzido por LPS foi o aumento de citocinas pró-inflamatórias no SNC. Layé e colaboradores (1995) mostraram que a administração periférica de LPS induziu o aumento dos níveis de mRNA do gene de IL-1 β no hipotálamo e hipocampo dos animais. O aumento nos níveis de transcritos de IL-1 β foi abolido pela vagotomia (retirada do nervo vago) (LAYE *et al.*, 1995). Porém, a redução nos níveis de mRNA só foi observada no hipotálamo e hipocampo, mas outras regiões cerebrais como a glândula hipófise ainda possuíam níveis aumentados de transcritos de IL-1 β (LAYE *et al.*, 1995). Estes dados sugerem que o nervo vago é uma importante via de comunicação entre o sistema imune e o SNC, mas não a única via. Alguns anos depois, Propes investigou o papel do eixo HPA nas respostas comportamentais induzidas por infecções. Para isto, administrou IL-1 β em ratos adrenalectomizados por via periférica ou central e observou que apenas aqueles que receberam a citocina periféricamente é que apresentaram comportamento tipo-depressivo (PROPES e JOHNSON, 1997). Também administrou nesses animais o LPS, e embora os ratos não adrenalectomizados também tenham apresentado comportamento tipo-depressivo, aqueles adrenalectomizados apresentaram um comportamento mais exacerbado. Além disso, recentemente foi demonstrado que o LPS ativa o eixo HPA e o fator de transcrição c-Fos, o qual está relacionado com a ativação neuronal (QADRI *et al.*, 2016). Em conjunto, estes dados sugerem que a desregulação do eixo HPA contribui para a indução do comportamento tipo-depressivo observado em roedores.

É interessante observar que o LPS é capaz de induzir modificações no SNC compatíveis com outras teorias causais do TDM, como a teoria monoaminérgica e a neurotrófica (MAES *et al.*, 2009). Após a administração de LPS, foram encontrados níveis reduzidos de monoaminas e aumento dos seus respectivos metabólitos no núcleo accumbens e no córtex pré-frontal medial de camundongos (VAN HEESCH *et al.*, 2014). Após administração periférica de LPS em camundongos, a redução nos níveis das monoaminas parece estar relacionada com o aumento na atividade das enzimas MAO-A e acetilcolinesterase (MING *et al.*, 2015). Além da redução nos

níveis das monoaminas, o LPS também induz uma diminuição nos níveis de neurotrofinas como o BDNF (GUO *et al.*, 2014; NOWACKA *et al.*, 2015), o fator de crescimento vascular endotelial (NOWACKA *et al.*, 2015) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (PARK *et al.*, 2011). Apesar dos efeitos do LPS reduzindo os níveis de monoaminas e neurotrofinas, o principal efeito deste componente bacteriano parece estar relacionado ao aumento de citocinas inflamatórias no SNC. Essa hipótese é embasada pelo trabalho de Konsman *et al.* (2008), que demonstrou que a administração intracerebroventricular de um antagonista de receptores de IL-1 β (IL-1ra) 4 h após a injeção de LPS reverteu a diminuição na interação social induzida pelo LPS em ratos (KONSMAN *et al.*, 2008). Entretanto, a administração de IL-1ra não reverteu o aumento de corticosterona induzido pelo LPS (KONSMAN *et al.*, 2008). Além disso, a injeção via i.c.v. de IL-1 β induziu a redução nos níveis de monoaminas na amígdala, no hipocampo, no hipotálamo e córtex frontal de ratos (SONG, MANKU e HORROBIN, 2008). Além da IL-1 β , o aumento nos níveis de outras citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-10 já foi observado em animais desafiados com o LPS, mostrando que este composto é capaz de ativar eventos inflamatórios no SNC (HASEGAWA-ISHII *et al.*, 2016a).

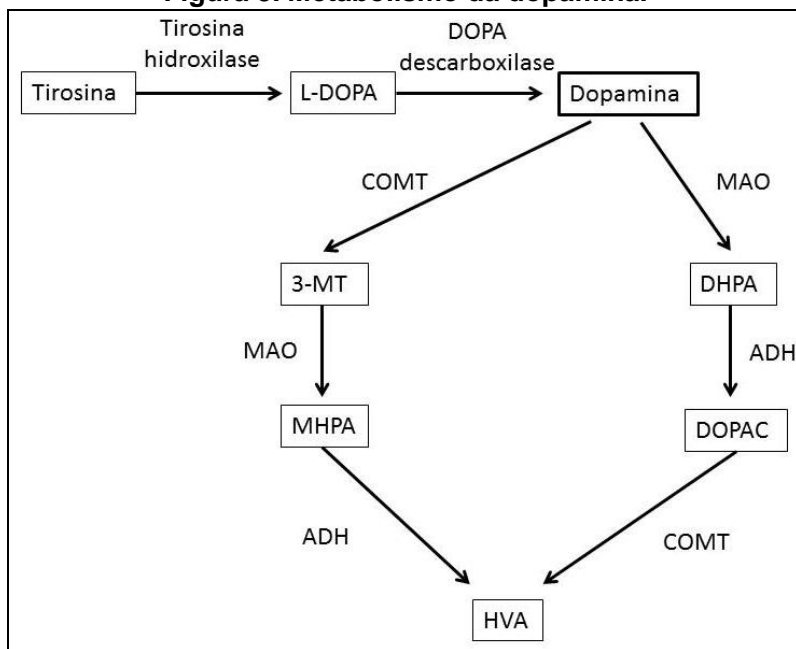
Além das citocinas, outros parâmetros inflamatórios também estão presentes, como o aumento nos níveis de ERO e ERN no hipocampo e córtex pré-frontal 24 h após a administração de 0,83 mg/kg de LPS via i.p. em camundongos (GAWALI *et al.*, 2016). Os níveis de ERO e ERN podem ser medidos indiretamente através do uso de anticorpos específico contra proteínas modificadas, tais como adutos com malondialdeído e formação de nitrotirosinas (AYALA, MUNOZ e ARGUELLES, 2014). É interessante ressaltar que a esculetina, um composto derivado da cumarina que possui efeito antioxidante, foi capaz de inibir o surgimento do comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS em camundongos (SULAKHIYA *et al.*, 2016). Isso sugere que os mecanismos oxidativos podem ser indutores importantes do comportamento tipo-depressivo. Ainda, a esculetina inibiu a ativação da iNOS, uma das enzimas responsáveis pela produção de óxido nítrico (SULAKHIYA *et al.*, 2016). As espécies reativas parecem estar relacionadas com os mecanismos de morte celular observada no

hipocampo de animais desafiados com o LPS (NOLAN *et al.*, 2003). A morte de neurônios hipocâmpais, no modelo do LPS, condiz com os achados em pacientes com TDM que também apresentam redução do volume hipocâmpal (FRODL *et al.*, 2008). Em conjunto, estes dados sugerem que durante o processo inflamatório, relacionado com a indução de um comportamento tipo-depressivo, as citocinas e as ERO/ERN são produzidas em maior quantidade, podendo ser utilizadas como um índice do processo inflamatório.

1.5. A inter-relação entre os sistemas dopaminérgico e imune no decurso de doenças neurológicas

A inflamação no SNC é capaz de provocar alterações nas vias dopaminérgicas e reduzir a produção e liberação de dopamina (FELGER e TREADWAY, 2016). Os primeiros estudos sobre o sistema dopaminérgico começaram na década de 50 com a descoberta da 3-hidroxitiramina, conhecida como dopamina, um metabólito do aminoácido tirosina (CARLSSON, LINDQVIST e MAGNUSSON, 1957). A dopamina possui a capacidade de modular a percepção sensorial, atuando sobre a retina e bulbo olfatório; participa da regulação da liberação de prolactina com ações sobre a glândula pituitária; participa do controle da temperatura corporal, na ingestão alimentar e no comportamento sexual atuando em vias hipotalâmicas; e atua no ajuste de pistas sensorio-motoras mediadas pelos gânglios basais (CALLIER *et al.*, 2003). Os neurônios dopaminérgicos apresentam dois modos distintos de atividade: tônica, que ocorre através do disparo espontâneo, e fásica, representada pelo padrão explosivo de disparos em resposta a estímulos. A dopamina é transportada para o interior de células próximas a fenda sináptica, incluindo o transporte para o interior do terminal sináptico (receptação). Uma vez no meio intracelular, a dopamina é metabolizada através da enzima MAO-A e MAO-B, localizadas membrana mitocondrial externa.

Figura 3. Metabolismo da dopamina.



A dopamina é sintetizada a partir do aminoácido tirosina através de duas etapas. Na primeira etapa a tirosina é hidroxilada pela enzima tirosina hidroxilase formando L-DOPA, e na segunda sofre uma descarboxilação pela ação da enzima DOPA descarboxilase. A degradação da dopamina pode ocorrer principalmente através de duas vias distintas, uma iniciada pela ação da COMT e outra iniciada pela MAO. Ambas as vias convergem para a formação de HVA. 3-MT = 3-metoxitiramina; ADH = Aldeído desidrogenase; COMT = catecol-O-metiltransferase; DHPA = 3,4-diidrofenilacetaldeído; DOPAC = ácido diidroxifenilacético; HVA = ácido homovanílico; L-DOPA = L-3,4-diidroxifenilalanina; MAO = monoaminas oxidase; MHPA = 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldeído. Fonte: o autor.

A MAO-A está presente em neurônios noradrenérgicos e dopaminérgicos e a MAO-B em células gliais e neurônios serotoninérgicos (ELSWORTH e ROTH, 1997; BINDA *et al.*, 2004). Essas enzimas convertem a dopamina em 3,4-diidrofenilacetaldeído ou 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldeído, dependendo da etapa da degradação em que agem. (Figura 3).

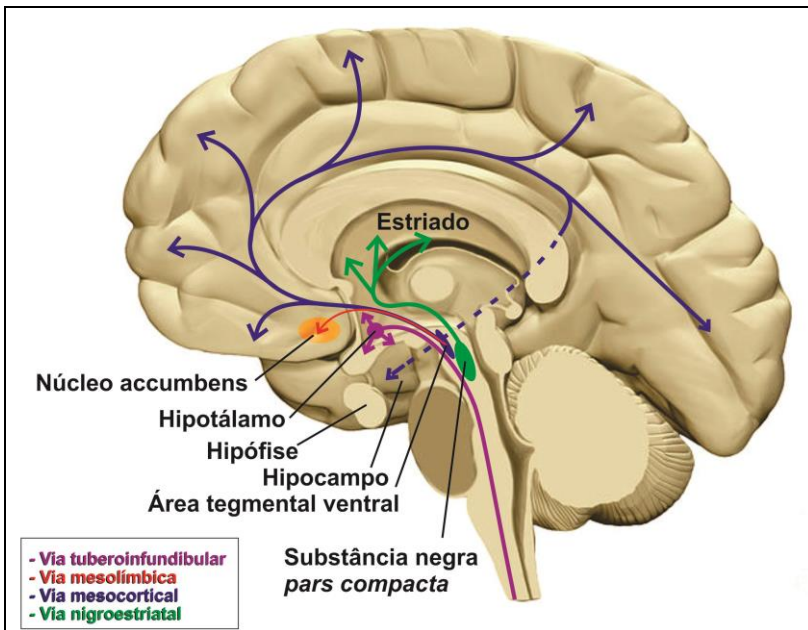
Estes serão metabolizados até ácido homovanílico, através da catalise envolvendo a enzima catecol-O-metiltransferase, presente no espaço entre neurônios (ELSWORTH e ROTH, 1997).

Os receptores dopaminérgicos são receptores metabotrópicos, ou seja, ligados a uma proteína G. Esses receptores são glicoproteínas com sete domínios transmembrana e foram classificados em duas subfamílias, D1 e D2. Fazem parte da subfamília D1 os receptores D1 (D1R) e D5 (D5R), os quais estão acoplados a proteína G estimulatória por meio da qual há ativação da enzima adenilato ciclase. Como resultado há aumento nos níveis intracelulares de AMPc, levando a ativação de proteínas cinase dependentes de AMPc, ativando uma cascata de fosforilação na qual outras proteínas celulares são moduladas. Os receptores de dopamina podem ser encontrados distribuídos por todo o SNC, tanto em neurônios como em células gliais, tendo densidades maiores nas regiões descritas abaixo, sendo observadas densidades diferentes para as diferentes subfamílias (LINEHAN *et al.*, 2015; RANGEL-BARAJAS, CORONEL e FLORAN, 2015; XING *et al.*, 2015). As regiões de maior densidade de receptores da subfamília D1 são o estriado ou putamen caudal, núcleo accumbens e na substância negra *pars compacta*. Já a subfamília D2 é mais abundante no estriado, globo pálido externo, centro do núcleo accumbens, amígdala, cortex cerebral, hipocampo e pituitária (RANGEL-BARAJAS *et al.*, 2015). Esses receptores não estão restritos ao SNC, podendo ser encontrados também nos sistemas cardiovascular, respiratório (RICCI *et al.*, 2006), renal (HUSSAIN e LOKHANDWALA, 2003) e imune (PACHECO, CONTRERAS e ZOUALI, 2014). Além disso, existem evidências de que os D1R e D5R também modulam a atividade de canais iônicos como: a) canais de cálcio (Ca^{2+}) do tipo L que aumentam as correntes iônicas e os de tipo N e P que diminuem as correntes iônicas nos neurônios estriatais; b) canais de K^+ de retificação interior acoplados a proteína G, reduzindo as correntes de potássio no núcleo accumbens (PODDA *et al.*, 2010); c) nos canais de sódio dependentes de voltagem em neurônios estriatais (MA *et al.*, 2015). Já os receptores D2 (D2R), D3 (D3R) e D4 (D4R) fazem parte subfamília D2 que, por meio de uma proteína G inibitória (G_i), inibem a atividade da enzima adenilato ciclase. Esses receptores também podem estar

acoplados a outros sistemas de segundos mensageiros, cuja ativação pode resultar em inibição da taxa de renovação de fosfatidil inositol, ativação de canais de K^+ de retificação interna acoplados a proteína G e inibição de canais de Ca^{2+} do tipo L, ativação da proteína cinase C, liberação de ácido araquidônico, entre outras (CALLIER *et al.*, 2003; BEAULIEU e GAINETDINOV, 2011). Desta forma, os receptores dopaminérgicos controlam a ativação neuronal por meio do controle do fluxo de íons cálcio, sódio e potássio. Entretanto, os receptores das subfamílias D1 e D2, por terem ações antagônicas entre si, parecem fazer uma regulação fina da atividade sináptica (VANDERSCHUREN *et al.*, 1999; ALLEN *et al.*, 2011; MAMAD *et al.*, 2015).

Em mamíferos, as vias dopaminérgicas ascendentes (Figura 4), que são feixes nervosos que partem de regiões inferiores e chegam até regiões superiores do SNC, que podem ser divididas em: a) mesoestriatal (ou nigroestriatal), que tem origem predominante na substância negra do mesencéfalo, cujas projeções neuronais chegam até o estriado dorsal, em particular os núcleos caudados e putamen; b) mesocortical, que surge predominantemente na área tegmental ventral de onde projeta seus axônios, sobretudo para o córtex pré-frontal; c) mesolímbica, que também tem origem predominante na área tegmental ventral, projetando seus neurônios para estruturas do sistema límbico, incluindo o núcleo accumbens, a amígdala e o hipocampo; e d) A via tuberoinfundibular, que se projeta do hipotálamo até a zona infundibular, é responsável pelo controle da produção do hormônio prolactina pela adenohipófise (GARDNER e ASHBY, 2000). A via dopaminérgica mesoestriatal está classicamente associada com o controle da movimentação (DAMIER *et al.*, 1999). Por outro lado, diferentes condições, tais como alerta, estresse, adição a drogas, e distúrbios psiquiátricos e neurológicos, tal como a DP, têm sido associadas a alterações nas vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical (FINLAY *et al.*, 1995; VOLKOW *et al.*, 2002).

Figura 4. Representação das vias dopaminérgicas no encéfalo.



Em lilás a via tuberoinfundibular, neurônios dopaminérgicos no núcleo arqueado do hipotálamo médio-basal que se projetam até à eminência média; Em vermelho a via mesolímbica, neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral do mesencéfalo e se projetam para o núcleo accumbens, a amígdala e o hipocampo; Em roxo a via mesocortical, neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral que se projetam para o córtex cerebral; Em verde a via nigroestriatal, neurônios dopaminérgicos na substância negra que se projetam para o corpo estriado. Fonte: adaptada de (SCARR *et al.*, 2013).

Além da participação no SNC, evidências demonstram que o sistema dopaminérgico apresenta efeitos múltiplos, diretos e importantes na maioria das células do sistema imune. Estudos anteriores demonstraram que as células do sistema imune podem ser reguladas pela dopamina, a qual atua em seus receptores, principalmente, nas CD, linfócitos T e B, células “natural killer” (NK), neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (MCKENNA *et al.*, 2002; PACHECO *et al.*, 2009). Assim a presença desses receptores nas células do sistema imunológico

sugere que a dopamina apresenta papel fisiológico no controle da resposta imune e que sua desregulação estaria associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes e câncer (PACHECO *et al.*, 2009). Por exemplo, os níveis de dopamina encontram-se alterados no cérebro de pacientes com EM, lúpus eritematoso sistêmico, doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatóide (PACHECO *et al.*, 2014). Nesse contexto, recente estudo demonstrou que as células tanto do sistema imune inato, quanto adaptativo, tais como as CD, macrófagos, linfócitos T e B, são capazes de sintetizar neurotransmissores. Essas células, quando estimuladas, liberam esses mediadores, contribuindo para a comunicação celular (FRANCO *et al.*, 2007). Portanto, essas interações, não somente sugerem que os neurotransmissores podem mediar a comunicação entre as células do sistema imunológico, mas também que as citocinas estão envolvidas com a interligação bidirecional entre o sistema imune e o SNC.

Comumente as células do sistema imune, tal como as CD, expressam a enzima tirosina hidroxilase, responsável pela síntese de dopamina, assim como as enzimas envolvidas na degradação da dopamina, tais como MAO-A e MAO-B, e o transportador vesicular de monoaminas, o qual é necessário para estocar a dopamina em vesículas intracelulares. No entanto, essas células não são capazes de expressar a enzima dopamina β -hidroxilase, a qual é responsável pela metabolização da dopamina em outras catecolaminas, tais como epinefrina e norepinefrina (PRADO *et al.*, 2012), e também não expressam o transportador de dopamina celular, que está envolvido com a captação do neurotransmissor do compartimento extracelular. Em resumo, as células do sistema imune podem sintetizar dopamina, mas não outras catecolaminas, assim como não são capazes de captar a dopamina dos compartimentos extracelulares.

A comunicação bidirecional entre o sistema imune e o nervoso tornou-se mais evidente após os estudos conduzidos por Cosentino e colaboradores (2007), os quais demonstram que os diferentes receptores dopaminérgicos possuem ações específicas sobre as células do sistema imune. Por exemplo, a ativação do receptor de dopamina D1 em células Treg reduziu a capacidade desse tipo celular em controlar a proliferação de células T efetoras. As amostras foram obtidas do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide - a principal doença

reumática autoimune (COSENTINO *et al.*, 2007). Esse efeito pró-inflamatório também foi observado no trabalho de Nakano *et al.* (2011), que observou que a ativação dos D1R, em linfócitos T CD4+ efetores, aumentou a secreção de IL-6, citocina responsável por induzir a produção de IL-17 - sugerindo aumento na população de linfócitos Th17 (NAKANO *et al.*, 2011). Os linfócitos Th17 são as principais células responsáveis pela manutenção das doenças autoimunes (BASDEO *et al.*, 2015), enquanto que as células Treg estão encarregadas da tolerância imune, ou seja, reduzem a resposta imune dificultando o surgimento de doenças autoimunes (BASDEO *et al.*, 2015). Assim, é esperado que ativação de receptores dopaminérgicos D1 tenha o papel de piorar os sintomas da EM. Ainda, a ativação do: a) D5R em CD induziu a produção de IL-23, citocina chave na diferenciação de células Th17 (PACHECO *et al.*, 2014); b) D4R em células T efetoras induziu senescência (PACHECO *et al.*, 2014); e c) D3R nas CD, através de mecanismos ainda não identificados, induziu aumento da resposta Th1 e diminuiu a resposta dependente de Th17 e Th2 (PACHECO *et al.*, 2014). Em contrapartida, o antagonismo de D2R induziu o acúmulo de células T IL-6+ e IL-17+ nas articulações, a destruição da cartilagem em pacientes com artrite reumatoide (NAKANO *et al.*, 2011). A ativação deste mesmo receptor reduziu significativamente a progressão dessa doença (MOBINI *et al.*, 2011). Nesse mesmo contexto, Jafari e colaboradores demonstram redução na expressão dos D2R em linfócitos Treg obtidos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (JAFARI *et al.*, 2013). Desta forma, dos receptores de dopamina do tipo-D1 parecem estar relacionados com a indução de doenças autoimunes, enquanto que os receptores dopaminérgicos tipo-D2 teriam um efeito de aumentar a tolerância imune, dificultando o surgimento das doenças autoimunes.

Os receptores D2 parecem ter a capacidade de modular a neuroinflamação, uma vez que a expressão D3R em linfócitos T está envolvida com a progressão da DP e pacientes com EM, após tratamento imunomodulatório, apresentaram redução na expressão desse receptor (COSENTINO *et al.*, 2012; GONZALEZ *et al.*, 2013). Ainda, o agonismo de D2R teve um efeito parcial na EAE, enquanto que o pramipexol (PPX) inibiu a liberação de mediadores citotóxicos de células NK (DIJKSTRA *et al.*, 1994; ZHAO *et al.*, 2013).

Conforme recentemente descrito, diferentes concentrações de dopamina podem apresentar efeitos distintos. Efeitos contrastantes foram observados nas células do sistema imune, especialmente, em linfócitos T. Por exemplo, baixas concentrações de dopamina, na ordem de 10 nM, induziram efeitos fisiológicos nas células T virgens, tais como: a) ativação direta dos linfócitos; b) aumento da proliferação; c) aumento na produção e secreção de IL-10 e TNF- α ; d) aumento na produção de IL-17 dependente de IL-6 via D1R/D5R, e e) aumento na migração/adesão celular (LEVITE, 2015). Concentrações moderadas, ~0,1 - 10 μ M, parecem induzir os mesmos efeitos descritos anteriormente, porém com aumento da inespecificidade, enquanto que altas concentrações, ~0.1 - 1 mM são tóxicas para os linfócitos T (LEVITE, 2015). Além da concentração da dopamina, outro aspecto importante no controle da resposta imune adaptativa baseia-se no estado em que se encontra a célula T, já que, a ação da dopamina em linfócitos T *naïve* induz sua ativação, enquanto que em células efetoras suprime as ações dessas (LEVITE, 2015).

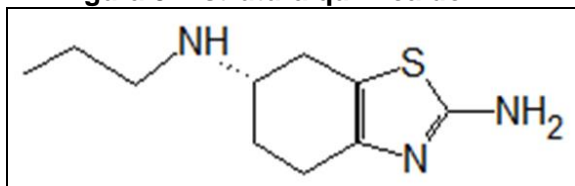
Como previamente descrito, existe uma inter-relação entre os sistemas dopaminérgico e imune. Assim, a dopamina e seus receptores parecem ter participação no desenvolvimento das doenças autoimunes e neuroinflamatórias. Desta forma, há a necessidade de se investigar os efeitos de agonistas e antagonistas de receptores de dopamina em modelos que induzem neuroinflamação.

1.6. Pramipexol

O PPX é um agonista de receptores dopaminérgicos da família D2, sendo as constantes de afinidade do inibidor para os receptores de $D2R_S = 3,9$ nM, $D2R_L = 2,2$ nM, $D3R = 0,5$ nM e $D4R = 5,1$ nM (NEWMAN-TANCREDI *et al.*, 2002; KVERNMO, HARTTER e BURGER, 2006). Também possui uma afinidade baixa ou insignificante ($K_i = 500 - 10.000$ nM) para os receptores de serotonina 5-HT $_{1A}$, 5-HT $_{1B}$, 5-HT $_{1D}$ e receptores α_2 -adrenérgicos (NEWMAN-TANCREDI *et al.*, 2002; KVERNMO *et al.*, 2006). Atinge o pico de concentração plasmática em aproximadamente 2 h e tem um tempo de meia-vida de cerca de 8,8 h (PUTRI *et al.*, 2016). Sua dose letal de 50% para camundongos, quando administrado por via intravenosa, é de

aproximadamente 155 mg/kg e, por via oral, de 1700 mg/kg (NCBI, 2016). O PPX é um composto hidrofílico, levemente básico, mas exibe uma alta biodisponibilidade em humanos (>90%) e é excretado pela urina (DIAO, SHU e POLLI, 2010). Devido a sua hidrofiliicidade, o PPX entra no SNC através de transportadores de cátions orgânicos dos tipo 2 e 3, pelos quais possui maior afinidade (DIAO *et al.*, 2010). Esse composto foi patenteado nos Estados Unidos como agente neuroprotetor em 1994 e aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1997 (Pramipexole marketed for Parkinson's disease, 1997; KVERNMO *et al.*, 2006). Sua nomenclatura química é (S)-N6-propil-4,5,6,7-tetraidro-1,3-benzotiazol-2,6-diamina e sua estrutura química está representada na Figura 5.

Figura 5. Estrutura química do PPX



Fonte: o autor.

A primeira menção do PPX na literatura foi no ano de 1987, sendo introduzido como um agonista de autoreceptores de dopamina e análogo a apomorfina (SCHNEIDER e MIERAU, 1987). Sua aplicabilidade clínica já foi estudada para fibromialgia (ROSKELL *et al.*, 2011), enxaqueca (SUZUKI *et al.*, 2013), esclerose lateral amiotrófica (YACILA e SARI, 2014), dano por luminosidade na retina (SHIBAGAKI *et al.*, 2015), transtorno bipolar (HUI POON, SIM e BALDESSARINI, 2015), AD (BENNETT *et al.*, 2015), depressão (FAWCETT *et al.*, 2016), bruxismo (CAHLIN, HEDNER e DAHLSTROM, 2016), algia (CAO *et al.*, 2016), sepse (KANG *et al.*, 2016), transtornos do sono (JUNG e ST LOUIS, 2016). Entretanto, devido a falta de estudos clínicos complementares até o presente momento, as aplicações terapêuticas deste composto foram aprovadas pelo FDA somente para doença de Parkinson e a síndrome das pernas inquietas (KVERNMO *et al.*, 2006; FDA, 2016). Essas patologias são causadas por alterações nas regiões motoras do cérebro, nas quais é possível observar redução nos níveis de

dopamina (WEN, 2012). Alguns autores sugerem que o PPX possa ser benéfico também na doença de Alzheimer. Embora isso seja embasado no efeito neuroprotetor do PPX (FERRARITONINELLI *et al.*, 2010; LAUTERBACH *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010). Até o momento somente um trabalho *in vitro* mostrou que o PPX impede a morte de células neuroblastoma humano induzida pela proteína β -amilóide (ABRAMOVA *et al.*, 2002). Um estudo com pacientes obteve resultados inconclusivos (BENNETT *et al.*, 2015). Parte do efeito neuroprotetor do PPX pode ser devido à indução do BDNF (BERGHAUZENMACIEJEWSKA *et al.*, 2015), sendo que para aumentar a expressão de proteínas neurotróficas, parece ser necessário que o PPX se ligue aos receptores de dopamina D2/D3 (PRESGRAVES *et al.*, 2004). Além disso, um outro possível mecanismo de proteção foi proposto por Ferrari-Toninelli e colaboradores (2010), sugerindo que esse composto agiria diretamente no interior das mitocôndrias reduzindo os níveis de ERO. Assim como a grande maioria dos medicamentos, o PPX também possui efeitos adversos. Dentre estes, os mais severos são halucinações, hipersexualidade e compulsão (jogos, alimentar e compras) (KATAOKA e UENO, 2014; MOORE, GLENMULLEN e MATTISON, 2014).

Apesar dos conhecimentos já existentes referentes aos efeitos dos receptores de dopamina no sistema imune, apenas um trabalho analisou os efeitos do PPX em parâmetros inflamatórios, neste estudo o composto reduziu citocinas em um modelo da DP em ratos (FARBOOD *et al.*, 2015b). Ainda que um estudo tenha demonstrado que o PPX possui efeito neuroprotetor contra os efeitos do LPS administrado via i.c.v., não foram observadas melhoras dos parâmetros inflamatórios (IRAVANI *et al.*, 2008). Até o presente momento, não existem trabalhos mostrando o efeito do PPX em um modelo de depressão induzida por inflamação periférica. Também não existem estudos com este composto com pacientes afetados pela esclerose múltipla ou na EAE.

2. JUSTIFICATIVA

A EM é classificada como uma doença neuroinflamatória autoimune e o modelo, que é o mais utilizado para avaliar o efeito de novos tratamentos e identificar novos alvos terapêuticos, é o da EAE. Animais induzidos com o modelo da EAE apresentam marcadores celulares e moleculares característicos como: *a)* infiltração de células inflamatórias, tais como macrófagos e linfócitos T, no SNC, *b)* ativação astrocitária e microglial no SNC (AKTAS *et al.*, 2005), *b)* presença de citocinas no SNC e *c)* geração de ERO no SNC (STYS, 2005; DUTTA e TRAPP, 2007). Estes parâmetros celulares e moleculares podem ser usados para mensurar a possível eficácia de um novo composto ou tratamento na EM.

Durante o desenvolvimento e progressão da DP, na qual também é observada neuroinflamação, uma menor degradação da proteína α -syn foi observada (ROTT *et al.*, 2011). Mais recentemente, a presença de inclusões contendo α -syn foi observada em pacientes com EM (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009). Além disso, diferentes autores sugerem que proteínas tipicamente envolvidas no desenvolvimento da DP, também poderiam estar envolvidas com a fisiopatologia da EM tais como, a parkina, a Pink-1 e a DJ-1 (WILHELMUS *et al.*, 2011). Corroborando com esses achados, dados recentes demonstram que o sistema dopaminérgico, assim como a dopamina, apresenta efeitos múltiplos e diretos no controle da resposta imunológica (PACHECO *et al.*, 2014).

A maioria das terapias existentes para o tratamento da EM são custosas, de administração parenteral e com efeitos adversos severos, dificultando a completa adesão ao tratamento. Além disso, nenhum dos tratamentos existentes é capaz de curar a EM, apenas reduzir sua progressão. Desta forma, a busca por compostos que curem ou retardem ainda mais a evolução desta doença é necessária. Por essa razão, a procura por terapias específicas, e que tenham ação sobre a resposta neuroinflamatória autoimune, característica da doença, é intensa no meio científico. Estas pesquisas têm o objetivo de descobrir novos alvos terapêuticos para o tratamento da EM. Assim, espera-se que os resultados deste trabalho possam fornecer subsídios importantes para o maior entendimento dos

mecanismos moleculares envolvidos na EM e promover o desenvolvimento de um tratamento mais eficaz.

Como previamente descrito, tanto indivíduos que são expostos à inflamação periférica quanto aqueles que possuem doenças neuroinflamatórias, tem maior risco de desenvolver TDM (MADEEH HASHMI *et al.*, 2013), incluindo a EM (TURNER *et al.*, 2016). Ressalta-se que cerca de 30% dos pacientes tratados não respondem à medicação, necessitando assim de novas terapias (AL-HARBI, 2012). Alguns autores sugerem que parte dos pacientes que são refratários aos tratamentos convencionais seja devido aos mecanismos inflamatórios (CATTANEO *et al.*, 2013; MILLER *et al.*, 2013; SLAVICH e IRWIN, 2014b; EURELINGS *et al.*, 2015). Uma vez que os receptores de dopamina são capazes de modular a ativação de células inflamatórias, optou-se por testar o PPX também no modelo de depressão induzido pelo LPS. Além disso, por já ser um medicamento aprovado pelo FDA e ANVISA, sua inserção no mercado como antidepressivo seria facilitada. Ainda, seu mecanismo de ação na neuroinflamação ainda é desconhecido. Entretanto, devido as ações da dopamina sobre as células do sistema imune, é esperado que um composto agonista de D2R/D3R tenha um efeito benéfico sobre doenças de cunho neuroinflamatório. Sendo assim, espera-se que este trabalho também possa contribuir para ampliar os conhecimentos relacionados ao seu efeito antidepressivo, o que pode estar relacionado com a neuroinflamação.

3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos protetores do PPX nos modelos de EM e de depressão, duas doenças que apresentam neuroinflamação, bem como contribuir para o conhecimento relacionado ao seu mecanismo de ação.

3.1. Objetivos específicos

- Analisar a expressão de α -syn, parkina e GPx, assim como os níveis de espécies reativas de oxigênio e a atividade da GPx, na medula espinhal e estriado de camundongos C57BL/6 induzidos com EAE, nas diferentes fases do modelo: indução (7 dias), aguda (15 dias) e crônica (40 dias ou mais);
- Avaliar o efeito do tratamento preventivo e terapêutico com PPX no desenvolvimento e progressão da EAE;
- Analisar se o tratamento com PPX reverte os efeitos e hiperalgico e motores durante a fase pré-motora e motora da EAE, respectivamente;
- Analisar se o tratamento com PPX reverte os efeitos da EAE relacionados a expressão de α -syn, parkina, e GPx, assim como os níveis de espécies reativas de oxigênio e a atividade da GPx, na medula espinhal e estriado de camundongos;
- Avaliar o efeito do PPX sobre a resposta neuroinflamatória, grau de desmielinização e ativação astrocitária após a indução da EAE;
- Investigar o efeito imunomodulador do PPX sobre o perfil de citocinas produzidas pelos linfócitos T, nos órgãos linfóides periféricos após o desenvolvimento da EAE.
- Avaliar o efeito do PPX no comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de LPS via intraperitoneal em camundongos, através do teste do nado forçado e *splash test*.
- Analisar o efeito do PPX sobre os parâmetros inflamatórios (níveis de IL-1 β , IL-6 e GFAP) no hipocampo de camundongos expostos ao LPS.

- Investigar se o PPX tem efeito sobre o estresse oxidativo e nitrosativo através da análise de produtos de peroxidação lipídica (níveis de adutos malondialdeído em proteínas), e de nitrosilação em proteínas (níveis de 3-nitrotirosina) em camundongos tratados com LPS.
- Investigar se a modulação farmacológica de receptores de dopamina interfere no efeito tipo-antidepressivo do PPX no modelo de depressão induzida por LPS.

3.2. Caracterização da problemática

Devido ao caráter inflamatório da EM, os fármacos utilizados no tratamento dos pacientes são imunomoduladores ou imunossupressores (TULLMAN, 2013). Entretanto, esses compostos induzem o aparecimento de efeitos adversos severos, sendo necessária a busca por novos tratamentos (TULLMAN, 2013). Diversos trabalhos têm demonstrado que a ativação de receptores específicos de dopamina possui efeitos antagônicos, e há evidências de que a ativação de receptores do tipo D2 e a inibição de receptores D1 teria um efeito anti-inflamatório (PACHECO *et al.*, 2014). Além disso, na última década, alguns relatos sugeriram que proteínas relacionadas com a fisiopatologia da doença de Parkinson podem ter participação no desenvolvimento da esclerose múltipla (PAPADOPOULOS *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2009; WITTE *et al.*, 2009). Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi o de analisar o efeito do PPX, agonista seletivo de receptores D2/D3, no modelo da Esclerose Múltipla, a EAE. Também, foram analisados os efeitos deste composto sobre as proteínas α -syn e parkina que, embora tenham sido ligadas à doença de Parkinson, estão alteradas tanto no SNC quanto em células mononucleares de pacientes com EM.

Durante o percurso da EM, é possível observar em um grande número de pacientes com sintomas de depressão (TURNER *et al.*, 2016). A depressão é um transtorno psiquiátrico caracterizado por sintomas como humor deprimido, aumento ou redução do apetite, insônia ou hipersônia, fadiga ou perda de energia diária, sentimento de inutilidade e ideação de morte (DSM 5, 2014). Alguns estudos observaram que pacientes que apresentavam esses sintomas tiveram redução de volume de áreas específicas do cérebro (e.g. hipocampo), aumento nos níveis de cortisol e de marcadores inflamatórios no soro (FRODL *et al.*, 2008; VREEBURG *et al.*, 2009; AL-HAKEIM, AL-RAMMAHI e AL-DUJAILI, 2015). Embora este transtorno seja multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais, já existem diversos estudos sugerindo a participação da neuroinflamação na patofisiologia do TDM.

Já foi demonstrada a presença de marcadores inflamatórios no hipocampo de animais submetidos a modelos de depressão, como aumento de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de

aumento de ativação microglial e astrogliar (HASEGAWA-ISHII *et al.*, 2016a). Também foram encontradas células imunes como leucócitos e linfócitos no hipocampo de animais com comportamento tipo depressivo (YIRMIYA *et al.*, 2001). Como apresentado na introdução geral e no primeiro capítulo desta tese, as células do sistema imune possuem receptores de dopamina e, desta forma, o PPX pode ter um efeito tipo-antidepressivo devido ao seu efeito imunomodulador. Porém, ainda não está claro se este efeito imunomodulador ocorre pela ativação destes receptores. Até o presente momento não existem trabalhos com o PPX no modelo de depressão induzida pelo LPS em camundongos. Embora os antidepressivos atualmente disponíveis no mercado também possuam efeito sobre o sistema imune, estes também possuem muitos efeitos adversos indesejados (e.g. na função cardíaca, na estabilidade hemodinâmica, na taxa de variabilidade cardíaca, no desejo sexual, reações extrapiramidais e síndromes neuroléptica maligna e serotoninérgica) (NISIJIMA, SHIODA e IWAMURA, 2007; HAWTHORNE e CALEY, 2015; KRONSTEIN *et al.*, 2015; NEZAFATI, VOJDANPARAST e NEZAFATI, 2015). Além destas limitações, podem ocorrer interações medicamentosas dos antidepressivos com medicamentos de uso cotidiano como os anti-inflamatórios não esteroidais (MOORE, POLLACK e BUTKERAIT, 2015). Ainda, para cada tentativa de tratamento, somente cerca de 30% dos pacientes atingem a remissão com os antidepressivos atualmente em uso (PAPAKOSTAS, 2016). Assim, a busca por novas estratégias terapêuticas é necessária, além do estudo dos mecanismos pelo qual estas moléculas agem, visando tornar as terapias mais eficazes. Desta forma, avaliamos a eficácia do PPX como um agente antidepressivo no modelo de TDM induzido por LPS, considerado um modelo inflamatório de depressão (STEPANICHEV *et al.*, 2014). Embora o modelo da EAE também induza comportamento tipo-depressivo (GENTILE *et al.*, 2015), durante os experimentos realizados foi observado que mesmo antes do surgimento dos sintomas motores os animais tiveram uma redução de sua locomoção no teste do campo aberto. A menor atividade locomotora invalidaria os testes comportamentais de depressão, desta forma, houve a necessidade da utilização de outro modelo de depressão com inflamação periférica seguida de uma resposta no SNC.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Animais

Para indução da EAE, foram utilizados camundongos C57BL/6, fêmeas, com idade de 6 a 12 semanas, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX), Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC). Os animais foram distribuídos homoganeamente entre os grupos e mantidos em caixas plásticas com 5 a 6 animais por caixa, as quais foram mantidas em câmaras com sistema controlado de circulação de ar, sob condições de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), além de livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo (6 às 18 horas) e os animais foram mantidos no laboratório por pelo menos 30 minutos para aclimação, antes da realização dos testes comportamentais. Todos os protocolos e procedimentos utilizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC, números de protocolo PP00811 e PP00956).

Para a indução de comportamento tipo-depressivo com o LPS foram utilizados camundongos fêmeas Swiss, pesando entre 40-55 g, com 60-120 dias de vida. Os animais foram mantidos em condições de temperatura ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e iluminação (das 7:00 às 19 horas) controladas, com livre acesso à água e comida. Foi respeitado um período de adaptação ao novo ambiente de permanência (biotério) de pelo menos 7 dias antes da execução dos testes comportamentais. Os camundongos foram designados de forma randômica para cada grupo. Todos os experimentos comportamentais foram realizados entre 09:00 e 13:00 horas, com cada animal sendo tratado somente uma vez. Os experimentos foram repetidos pelo menos mais uma vez para determinação da reprodutibilidade dos resultados, sendo estes a soma de todos os experimentos. Os animais foram ambientados no local da experimentação 60 minutos antes da observação comportamental. O fornecimento dos animais foi realizado pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantido no Biotério Setorial do Laboratório de Defesas Celulares.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC sob o protocolo PP00735).

3.3.2. Agentes farmacológicos e reagentes

Foi utilizada uma formulação comercial do PPX (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Guarulhos, Brazil), glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG₃₅₋₅₅), adjuvante completo de Freund's (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) H37Ra (Difco, Detroit, MI, USA), e apomorfina (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) solubilizados em solução salina 0.9 %. O LPS de *Escherichia coli* (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) foi solubilizado em tampão fosfato salina (PBS; in mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 10, KH₂PO₄ 1.8, pH 7.4). O haloperidol, um antagonista não-seletivo de receptores de dopamina (SERAFINE, BRISCIONE e RILEY, 2012), e a sulpirida (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.), um antagonista de receptores de dopamina D2R/D3R (CITO *et al.*, 2015), foram diluídos imediatamente antes do uso em PBS com 5% de etanol ou 5% de dimetilsulfóxido, respectivamente. Todos os fármacos foram administrados intraperitonealmente e os animais controle receberam o veículo correspondente.

3.3.3. Protocolos experimentais

3.3.3.1. Modelo experimental de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e tratamentos com agonista D2/D3 dopaminérgico

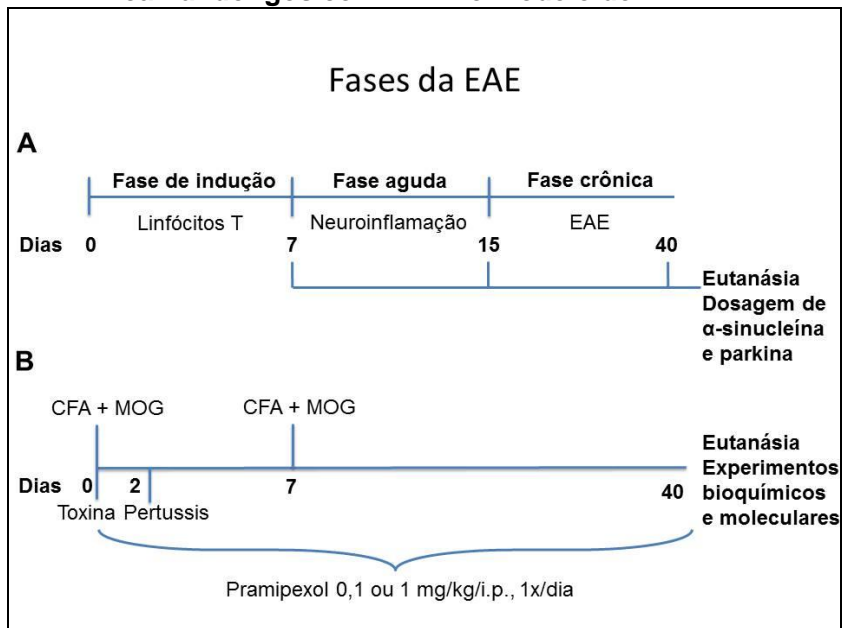
A EAE foi induzida com inoculação de 100 µL de emulsão contendo 200 µg de um peptídeo com a mesma sequência primária da glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG₃₅₋₅₅), em adjuvante incompleto de Freund (CFA), suplementado com 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) H37Ra (Difco, Detroit, MI, USA) em ambos os flancos traseiros. Além disso, cada animal recebeu 300 ng de toxina de *Bordetella pertussis* em

200 µL de solução salina por via intraperitoneal no dia 0 e no dia 2 após a primeira imunização. A primeira aplicação de toxina pertussis reduz a ativação da óxido nítrico sintase nos macrófagos (CERNY *et al.*, 2015), reduzindo a degradação do MOG₃₅₋₅₅ e aumentando sua apresentação aos linfócitos T. Por outro lado, a segunda aplicação da toxina pertussis aumenta a proliferação das células T (GRENIER-BROSSETTE *et al.*, 1991), aumentando a velocidade de desenvolvimento do modelo. Além disso, o MOG₃₅₋₅₅ é administrado juntamente com o CFA pois a presença de *Mycobacterium* sp. ativa células imunes como os macrófagos (ISHIKAWA, MORI e YAMASAKI, 2016). Assim, por reconhecerem um peptídeo de mielina, o sistema imune passa a atacar a mielina no SNC, caracterizando uma ação autoimune. Os animais foram pesados e examinados diariamente, durante 40 dias. As manifestações do modelo foram determinados por estágios conforme segue: sem sinais (estágio 0), perda do tônus da cauda (estágio 1), paralisia leve dos membros posteriores e dificuldade no retorno a posição normal (estágio 2), paralisia severa dos membros posteriores, com alterações motoras também nos membros anteriores (estágio 3), tetraplegia e moribundos (estágio 4) ou morte (estágio 5). Outros grupos de animais foram avaliados até o 13º dia após a imunização quanto a hiperalgesia, nos quais não foi observado o surgimento das manifestações locomotoras típicas, caracterizando assim a fase pré-motora da EAE.

A fim de determinar o papel dos receptores dopaminérgicos D2/D3 durante a gênese da resposta autoimune induzida pela EAE (fase de indução), os animais foram tratados com o agonista dopaminérgico D2/D3, PPX, durante os dias 0 ao dia 40 pós-imunização. Os animais foram tratados via i.p., uma vez ao dia, com PPX (0,1 ou 1 mg/kg) ou solução salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg) (Figura 6). A escolha das doses foi baseada em protocolo piloto e trabalhos prévios (ELHAK *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010). Os períodos escolhidos para a eutanásia dos animais e análises bioquímicas correspondem às fases: **indução**, 7 dias – referente à ativação periférica e proliferação de linfócitos T; **aguda**, 15 dias – infiltração dos linfócitos T através da BHE; **crônica**, a partir do dia 15 – estabelecimento da resposta neuroinflamatória e desmielinizante. Após a eutanásia no 40º dia, órgãos linfóides secundários (linfonodo inguinal), medula

espinal e estriado foram obtidos e conservados em freezer - 80°C até a execução das análises.

Figura 6. Desenho experimental do tratamento de camundongos com PPX no modelo de EAE.



A) Diagrama das fases da EAE, fase de indução – reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T, fase aguda – neuroinflamação com invasão do SNC pelos linfócitos T, fase crônica – estabelecimento do modelo com presença das manifestações motoras. B) Diagrama experimental, de indução da EAE e do tratamento. Fonte: o autor.

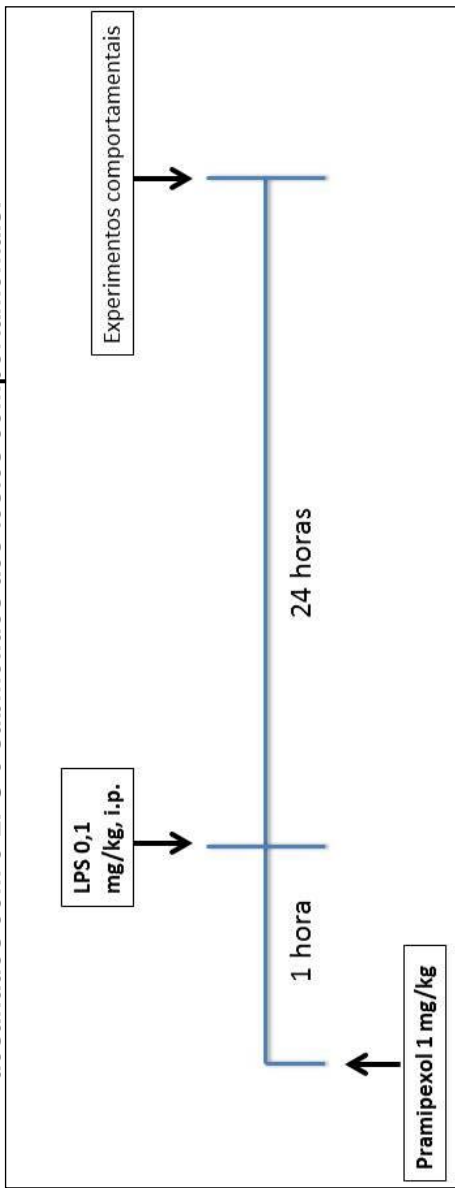
3.3.3.2. Investigação do efeito antidepressivo do PPX no modelo de depressão induzida pela administração de LPS

O LPS desencadeia uma resposta pró-inflamatória e é conhecido por causar um comportamento tipo-depressivo em animais, quando administrado periféricamente (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013; FARZI *et al.*, 2015; ARAKI *et al.*, 2016). Para evitar a interferência do comportamento tipo-doente, comumente observado em camundongos expostos ao LPS, as análises comportamentais foram realizadas 24 horas após a

administração do LPS (DUNN e SWIERGIEL, 2005; XIE *et al.*, 2012; MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). Adicionalmente, a dose usada do LPS (0,1 mg/kg) é muito menor do que aquela usada em modelos de sepse em camundongos (~10 mg/kg) (FAIRCHILD *et al.*, 2009). Baseado em um estudo piloto (4-5 animais por grupo), e em estudos prévios (JOYCE *et al.*, 2004; INDEN *et al.*, 2009; SCHULTE-HERBRUGGEN *et al.*, 2012; BERGHAUZEN-MACIEJEWSKA *et al.*, 2014), selecionou-se a dose de 1 mg/kg do PPX para investigar o potencial efeito tipo-antidepressivo deste composto nas alterações comportamentais induzidas pelo LPS. Primeiramente, para analisar o efeito agudo do PPX (Figura 7), o PPX (1 mg/kg, i.p.) ou veículo (NaCl 0.9%) foram administrados nos animais seguido da administração do LPS (0,1 mg/kg, i.p.) após 60 minutos. Vinte e quatro horas após a injeção do LPS, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Na rodada seguinte de experimentos, administrou-se diariamente o PPX 1 mg/kg ou o veículo por 7 dias, e 60 minutos após a última administração de PPX os animais foram expostos ao LPS (0,1 mg/kg, i.p.). Vinte e quatro horas após a aplicação do LPS, os testes comportamentais foram realizados conforme consta na Figura 8. Para investigar se o efeito tipo-antidepressivo estava relacionado à ativação dos receptores de dopamina administrou-se haloperidol (0,2 mg/kg, i.p.), antagonista inespecífico de receptores dopaminérgicos, ou a sulpirida (50 mg/kg, i.p.), antagonista de receptores de dopamina D2/D3, 30 min antes de cada injeção de PPX por 7 dias, conforme indicado na Figura 9. Ainda, para avaliar a participação dos receptores de dopamina tipo-D2 no efeito tipo-antidepressivo, o agonista destes receptores, apomorfina (50 µg/kg, i.p.), foi administrado agudamente uma hora antes da injeção de LPS. Também, foi realizado o tratamento com apomorfina por sete dias, utilizando-se o mesmo protocolo do PPX, mas usando em seu lugar a apomorfina. Caso a apomorfina apresente um efeito tipo-antidepressivo isso confirmaria os resultados obtidos com os tratamentos com os antagonistas dopaminérgicos mais o PPX. As doses efetivas dos agonistas/antagonista de receptores dopaminérgicos foram escolhidas conforme estudos prévios (VAMVAKIDES, 1999; CUNHA *et al.*, 2012). Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por

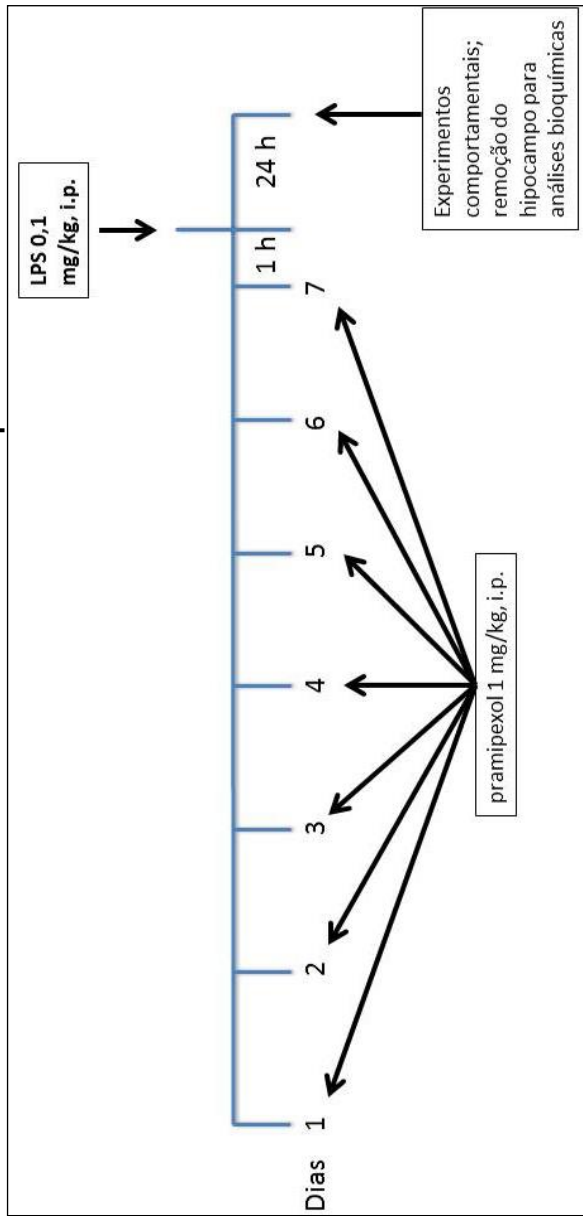
decapitação, os hipocampus foram removidos e armazenados à -80°C até serem utilizados.

Figura 7. Protocolo experimental da administração aguda de PPX em camundongos desafiados com o LPS e submetidos aos testes comportamentais.



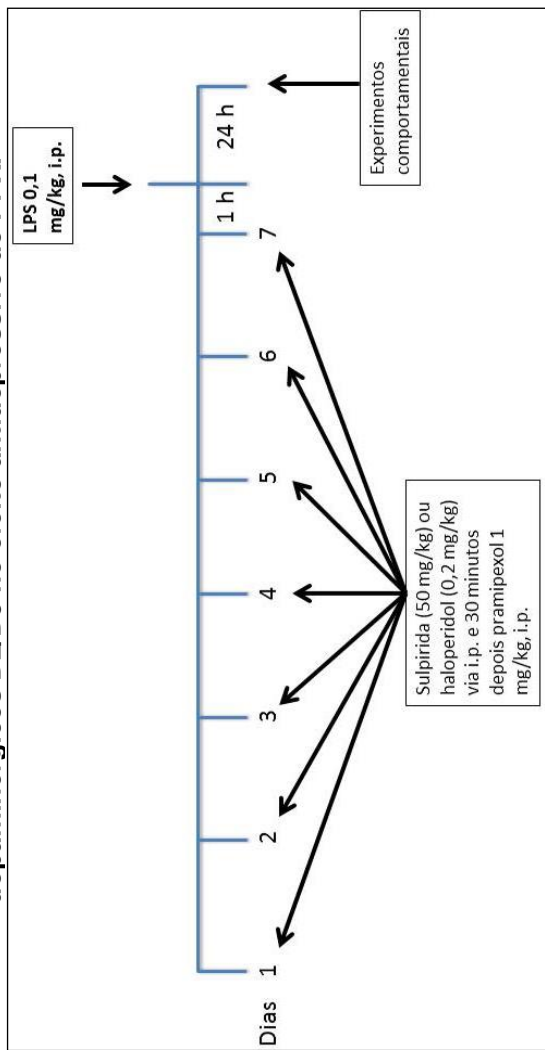
Administrou-se PPX na dose de 1 mg/kg, i.p., e 60 minutos após seguiu-se a administração do LPS na dose de 0,1 mg/kg, i.p., em camundongos fêmeas. Vinte e quatro horas após a administração do LPS foram realizados os experimentos comportamentais. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina 0,9%). Fonte: o autor.

Figura 8. Protocolo experimental da administração repetida de PPX em camundongos desafiados com o LPS e submetidos aos testes comportamentais.



Administrou-se o PPX na dose de 1 mg/kg, i.p., por sete dias consecutivos e, 60 minutos após a última administração, seguiu-se a injeção de LPS na dose de 0,1 mg/kg, i.p., em camundongos fêmeas. Vinte e quatro horas após a administração do LPS foram realizados os experimentos comportamentais, os quais foram seguidos de dissecação do cérebro e retirada do hipocampo para as análises bioquímicas. O grupo veículo recebeu o tratamento com solução de salina 0,9 %. Fonte: o autor.

Figura 9. Protocolo experimental para análise da participação dos receptores dopaminérgicos D2/D3 no efeito antidepressivo do PPX.



Para determinar se o efeito do PPX era devido a ativação de receptores D2 e D3 administrou-se sulpirida, um antagonista seletivo de receptores D2, na dose de 50 mg/kg/i.p. ou haloperidol, um antagonista de receptores D2 e D3, na dose de 0,2 mg/kg/i.p. e 30 minutos depois injetou-se o PPX na dose de 1 mg/kg/i.p. por sete dias consecutivos. Sessenta minutos após a última administração dos antagonistas e do PPX seguiu-se a injeção de LPS na dose de 0,1 mg/kg/i.p. em camundongos fêmeas. Vinte e quatro horas após a administração do LPS foram realizados os testes comportamentais. O grupo controle recebeu como tratamento apenas os veículos específicos, como descrito em Materiais e Métodos. Fonte: o autor.

3.3.4. Experimentos Comportamentais

3.3.4.1. Teste do nado forçado (TNF)

O teste do nado forçado (TNF) foi desenvolvido por Porsolt *et al.* (1977) a fim de avaliar o potencial antidepressivo de compostos químicos. O modelo sugere que a observação do tempo que um animal permanece imóvel quando é submetido a uma situação da qual não há escapatória, fornece evidência de efeito antidepressivo (PORSOLT, BERTIN e JALFRE, 1977). Assim, o tempo total de imobilidade foi observado no TNF como previamente descrito (PORSOLT *et al.*, 1977). Brevemente, os camundongos foram forçados a nadar individualmente em um cilindro (10 cm de diâmetro, 25 cm de altura), contendo 19 cm de água à $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo total de imobilidade foi registrado durante 6 min por observadores cegos aos grupos tratados. Os animais foram considerados imóveis quando cessavam as tentativas de escapar e permaneciam flutuando na água, fazendo movimentos necessários apenas para manter a cabeça acima d'água.

3.3.4.2. Teste do campo aberto (TCA)

Para descartar uma possível interferência na locomoção no TNF, a atividade locomotora dos animais foi avaliada no teste do campo aberto (TCA) antes de serem submetidos ao TNF, como previamente descrito (ROSA *et al.*, 2014). Brevemente, os animais foram colocados individualmente em uma caixa de madeira (40 x 60 x 50 cm), com 12 quadrantes iguais representados no piso. O número de cruzamentos de quadrantes realizados pelos camundongos foi contabilizado por um período de 6 minutos, sendo considerado um cruzamento somente quando todas as quatro patas do animal atravessavam uma linha. Antes de cada teste, o piso do aparato foi limpo com uma solução de álcool 10% para esconder pistas olfatórias do camundongo anterior.

3.3.4.3. Splash Test

O *splash test* foi realizado como previamente descrito (MORETTI *et al.*, 2015). Brevemente, uma solução com 10% de sacarose foi borrifada no dorso dos animais, os quais foram colocados individualmente em um funil de vidro. Após o borrifo da solução de sacarose nos camundongos, a latência para iniciar a autolimpeza foi utilizada como medida de comportamento motivacional e de autocuidado. O tempo total de autolimpeza foi contado por um período de 5 min por observadores cegos aos grupos tratados e utilizado como uma estimativa da presença de anedonia. Os funis e a bancada foram limpos com uma solução de etanol 10% para esconder pistas olfatórias deixadas pelo animal anterior.

3.3.4.4. Testes de algesia

Os testes comportamentais foram realizados somente no período que precede o estabelecimento da EAE, ou seja, do 1° ao 13° dia p.i., uma vez que após este período o déficit locomotor apresentado pelos animais impossibilita sua realização.

O desenvolvimento da hiperalgesia mecânica foi avaliado utilizando-se filamentos de von Frey pelo método de frequência de retirada (BORTALANZA *et al.*, 2002). A frequência de resposta de retirada foi avaliada após 10 aplicações dos filamentos de von Frey com intervalo de 3 segundos (VFH, Stoelting, Chicago, IL, EUA).

Para a avaliação da hiperalgesia térmica ao frio, utilizou-se o método da acetona adaptado de Walczak e Beaulieu (WALCZAK e BEAULIEU, 2006). Os camundongos foram alocados em compartimentos de acrílico transparente (8 x 8 x 18 cm) com plataformas de arame elevadas e aclimatizados durante 30 minutos. Após a aplicação de 20 µL de acetona na pata direita traseira do animal, a resposta foi avaliada cronometrando-se o tempo em que o animal recolheu, sacudiu, lambeu ou mordeu a pata no período de 20 s após o estímulo nocivo. Foram realizadas três medidas do tempo de resposta, as quais foram registradas em intervalos de aproximadamente 15 min.

3.3.5. Análises Bioquímicas

3.3.5.1. Detecção de proteínas por Western e slot blot

O *Western blot* foi executado conforme descrito previamente (LEAL *et al.*, 2002). Medula espinhal, estriado e o hipocampo foram preparadas conforme descrito previamente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). As proteínas (50 µg de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando gel 12-15%. As proteínas do gel foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) utilizando uma corrente de 0,75 mA por cuba durante 1,25 h. As membranas foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As proteínas IL-1 β , GFAP, parkina, α -syn, e GPx foram detectadas com o uso de anticorpos primários específicos diluídos em TBS-T contendo soro albumina bovina (BSA) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2,5%, pH 7,5 e azida sódica 0,04%) nas diluições, 1:1000 (anti-IL-1 β Cell Signaling), 1:50000 (GFAP – Abcam), anti-parkina (Abcam, ab6177, 51 kDa, 1:1000), anti- α -sinucleína (Cell Signaling, #4179, 18 kDa, 1:1000), anti-GPx 1 (Abcam, ab-16798, 23 kDa, 1:1000) e anticorpos secundários específicos conjugados com a peroxidase (1:10000) diluído em TBS-T, contendo soro albumina bovina (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5)..

As bandas de proteínas foram quantificadas por densitometria e normalizadas pela β -actina (Sigma, A3854, 42 kDa, 1:20.000) como controle padrão da aplicação de proteínas. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%). As reações foram desenvolvidas por quimiluminescência e reveladas com o uso de filme radiográfico específico (Amersham Hyperfilm®, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) ou através do fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Todas as etapas de bloqueio e de incubação foram seguidas por três lavagens (5 min cada) das membranas com TBS-T, mais 2 lavagens com TBS antes da reação quimiluminescente. Os filmes foram digitalizados e a densidade óptica das bandas foi

quantificada com o programa Image Studio Lite Ver. 5.2 (LI-COR Biosciences Lincoln, NE, EUA).

O slot blot foi realizado através da aplicação de 4 µg do homogenato diluído em 150 µL de PBS, e aplicado em um aparato contendo em seu interior uma membrana de nitrocelulose. As amostras foram drenadas sob a aplicação de vácuo durante 15-20 min. As membranas foram bloqueadas por 60 minutos com uma solução de leite desnatado em TBST, e em seguida, lavadas 3 vezes com TBST. As membranas foram, então, incubadas durante a noite à 4°C com os anticorpos anti-3-NT (1:2500) ou anti-MDA (1:10000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), a intensidade das bandas foi normalizada pela coloração das proteínas com Ponceau-S. As membranas de slot blot foram reveladas e analisadas da mesma forma que as membranas de western blot.

3.3.5.2. Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)

Estruturas centrais (medula espinhal e estriado) foram isoladas, pesadas e homogeneizadas em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 e centrifugadas (20,000 g por 30 min à 4°C). A dosagem de GPx foi analisada de acordo com o protocolo previamente publicado (WENDEL, 1981). Os valores foram expressos como % em relação ao grupo naíve. O conteúdo proteico foi analisado pelo método de Lowry.

3.3.5.3. Ensaio do Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-dopamina)

A produção intracelular de ERO foi avaliada utilizando-se o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína reduzido (H₂DCF-dopamina) de acordo com o método descrito anteriormente (SADUN *et al.*, 1987; LEBEL *et al.*, 1990).

3.3.6. Análise histológica

Quarenta dias após a indução da EAE, os animais foram eutanasiados e as medulas espinhais foram removidas na altura

da região lombar e pós-fixadas por 24 h na mesma solução paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Em seguida os tecidos foram embebidos em parafina após desidratação e diafanização, e seccionadas em cortes de 5 μ m de espessura. As análises histológicas dos focos inflamatórios e áreas de desmielinização foram realizadas com hematoxilina-eosina (H&E) e *luxol fast blue* (LFB), respectivamente. A densidade ótica foi medida em 5 a 6 campos por corte, na região da substância branca, utilizando-se o software ImageJ v. 1.6 (NIH – USA).

3.3.7. Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica na medula espinhal dos animais foi realizada 40 dias após a indução da EAE, conforme descrito anteriormente (DUTRA *et al.*, 2011). A imunodeteção da proteína de interesse foi realizada utilizando o seguinte anticorpo: anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (1:600, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). A densidade ótica foi medida em 5 a 6 campos por corte, na região da substância branca, utilizando-se o software ImageJ v. 1.6 (NIH – USA).

3.3.8. Dosagem de citocinas por ELISA

Após 40 dias de indução da EAE os animais foram eutanasiados, os linfonodos inguinais e hipocampos coletados para a avaliação da expressão de citocinas. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (0,05% Tween 20, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA, 0,5% albumina bovina sérica, 0,4 M NaCl, 0,1 mM PMSF, e 2,0 μ g/ml aprotinina). Os homogenatos foram centrifugados a 3000 g, e a 4°C, por 10 min, e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até seu uso. Os níveis de IL-17, IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram analisados com um kit de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA), e realizados de acordo com o protocolo do fabricante.

3.3.9. Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (n corresponde ao número de animais/grupo incluído nas análises). As análises estatísticas dos experimentos com EAE foram avaliadas utilizando ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* para comparações múltiplas, quando apropriado. Também foi utilizada a regressão linear para análise da variação de peso corporal. Os experimentos com LPS foram analisados através da ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. Para analisar o resultado do experimento com os antagonistas foi utilizada a ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. Diferenças estatísticas foram aceitas quando $P < 0.05$.

3.4. Resultados

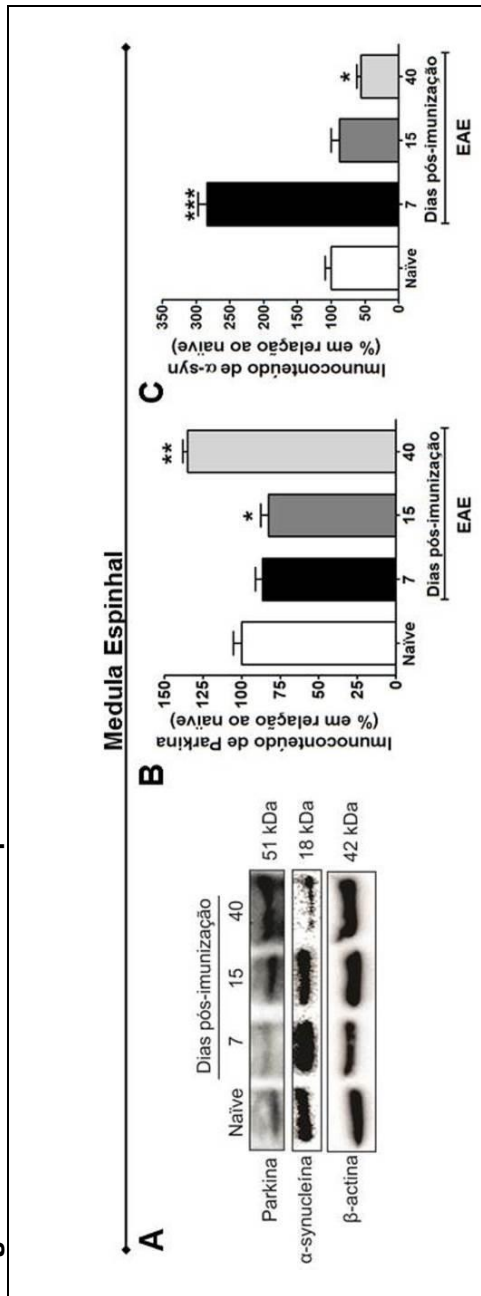
3.4.1. Caracterização dos níveis de parkina e α -sinucleína na EAE

De acordo com o trabalho anteriormente publicado, o aumento do imunoconteúdo de parkina tem sido observado tanto em doenças do envelhecimento quanto na EM (WILHELMUS *et al.*, 2012). Além disso, essa proteína promove a remoção da α -syn e de proteínas malformadas e/ou inativas, o que é associado a sua atividade de ubiquina-ligase, conduzindo às proteínas poliubiquitinadas à degradação através do sistema ubiquitina-proteassoma (PETRUCELLI *et al.*, 2002; RILEY *et al.*, 2013). Assim, inicialmente avaliou-se os níveis das proteínas parkina e α -sinucleína para determinar se as alterações observadas em trabalhos prévios poderiam ser reproduzidas no modelo da encefalomielite autoimune experimental em camundongos. Além disso, a quantificação dessas proteínas nesse modelo ainda não foi realizada durante as diferentes fases da EAE: indução, aguda e crônica. Os dados apresentados demonstram uma redução de 18% na expressão de parkina no dia 15 (aguda) p.i. (Figura 10A e B), seguido de um aumento de 34% no dia 40 p.i. (crônica) na medula espinhal dos animais EAE, quando comparado aos animais do grupo naíve. Um aumento no imunoconteúdo de

parkina foi observado no estriado nos dias 15 e 40 após a indução da EAE, de 30 % e 44 %, respectivamente (Figura 10D e E). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de uma via que apresentou um $F_{(3, 14)} = 22,55$ e $p < 0,001$ para a medula e um $F_{(3, 18)} = 12,43$ e um $p < 0,001$ para o estriado.

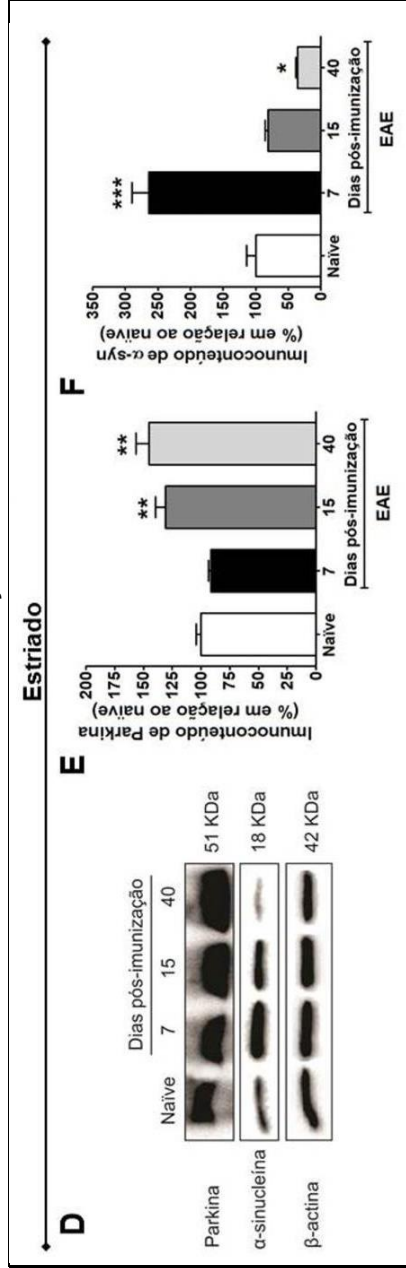
A proteína α -syn apresenta efeitos deletérios em diferentes doenças neurodegenerativas, tais como a DP e, mais recentemente foi correlacionada com a progressão da EM (MIZUTA *et al.*, 2006). No entanto, alguns autores sugerem que a α -syn não mutada possui ação antioxidante e neuroprotetora (MARQUES e OUTEIRO, 2012; LAZARO *et al.*, 2014). Assim, o próximo objetivo desse estudo foi avaliar os níveis da proteína α -syn na medula espinhal e no estriado dos animais com EAE, em diferentes fases do modelo. De maneira significativa, no 7º dia após a injeção de MOG₃₅₋₅₅, o imunoconteúdo de α -syn aumentou tanto na medula espinhal (Figura 10A e C), bem como no estriado (Figura 10D e F), com aumento de $253 \pm 42\%$ e $264 \pm 25\%$, respectivamente, quando comparado aos animais do grupo naïve. Em contrapartida, o imunoconteúdo de α -syn reduziu de maneira significativa nos dias 15 (87 ± 13 e $80 \pm 5\%$) e 40 p.i. (49 ± 8 e $36 \pm 2\%$), em ambos os tecidos analisados, respectivamente. Estes resultados foram avaliados através da ANOVA de uma via com um $F_{(3, 19)} = 100,5$ e $p < 0,001$ para a medula e um $F_{(3, 17)} = 37,83$ e $p < 0,001$ para o estriado.

Figura 10. Análise dos níveis de parkina e α -sinucleína durante o desenvolvimento da EAE.



Continua...

Continuação



Os animais EAE apresentaram alterações nos níveis de parkina e α -sinucleína durante a progressão do modelo. (A e D), figuras representativas da detecção por western blot parkina e α -sinucleína, na medula espinal e estriado respectivamente; (B e E) quantificação da densidade ótica das bandas marcadas para parkina, na medula espinal e estriado respectivamente, (C e F) e para α -sinucleína, na medula espinal e estriado respectivamente. As análises foram realizadas nos dias 7, 15 e 40 após a indução da EAE. Os dados são apresentados como média \pm EPM (N = 4-5 animais/grupo); ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Newman-Keuls (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ grupo EAE versus naive).

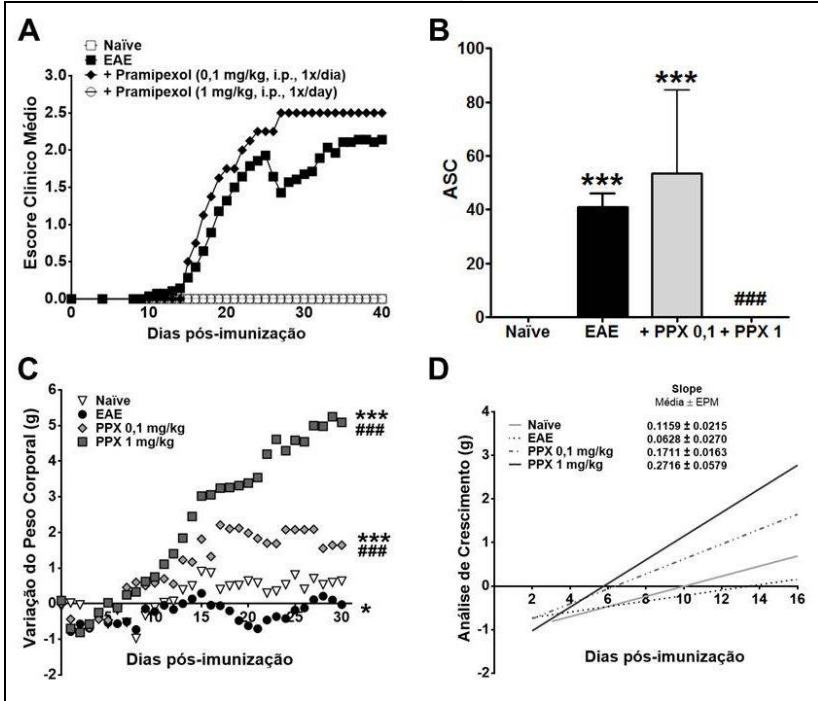
3.4.2. Efeito do PPX sobre os sintomas motores da EAE

Dados prévios demonstraram que a ativação de receptores dopaminérgicos possui efeitos antagônicos sobre os linfócitos T, já que a ativação de D1R e D3R aumentou a população de células Th17 e a ativação de D4R induz a morte desses linfócitos (COSENTINO *et al.*, 2007; PACHECO *et al.*, 2014). Entretanto, o agonista D2R, ropirinole, reduziu a citotoxicidade mediada por células *natural killer* (ZHAO *et al.*, 2013). O efeito preventivo do PPX foi investigado, inicialmente, através da administração das doses de 0,1 e 1 mg/kg, a partir do dia 0 p.i. Conforme mostra a Figura 11, os animais do grupo EAE apresentaram paralisia crescente a partir do 16º dia (escore médio de 0,5) após a imunização e atingiram o escore clínico máximo a partir do 35º dia (escore clínico de 2,5), quando comparado aos animais do grupo naïve. Por outro lado, os animais tratados com PPX (1 mg/kg, i.p., uma vez ao dia) não desenvolveram a EAE, se comportando de maneira similar aos animais do grupo naïve (Figura 11A), com inibição de 100% dos sintomas, baseado no gráfico da área sob a curva (Figura 11B). Em contrapartida, a dose de 0,1 mg/kg não apresentou efeito protetor quando comparado aos animais do grupo EAE (Figura 11A e B). A análise da área sob a curva através da ANOVA de uma via apresentou um $F_{(3, 25)} = 7,092$ e $p < 0,001$.

Além da escala de escore de comprometimento neurológico, a perda de peso é um sintoma característico da EAE e sua análise é mensurada pela medida do peso diário, assim como a variação do peso corporal no pico da doença, quando comparado ao peso inicial (STROMNES e GOVERMAN, 2006a). De acordo com a figura 7C e D, os animais do grupo EAE apresentaram redução do peso corporal já nos primeiros dias após a imunização, a qual se estabilizou, em contrapartida os animais do grupo naïve mantiveram um crescimento contínuo, da mesma forma que os animais tratados com PPX. Os animais tratados com PPX apresentaram ganho de peso corporal maior que o grupo naïve (Figura 11C), o que pode ser observado pela maior inclinação na reta de ganho de peso (Figura 11D). A reta do ganho de peso foi analisada através de uma regressão linear das fases de indução e neuroinflamação apresentando inclinações de $0,1159 \pm 0,02151$ para o grupo naïve, $0,06279 \pm$

0,02704 para o grupo EAE, $0,1711 \pm 0,01633$ para o grupo PPX 0,1 mg/kg, e $0,2716 \pm 0,05791$ para o grupo PPX 1 mg/kg.

Figura 11. Efeito do tratamento preventivo com PPX no desenvolvimento e progressão da EAE.

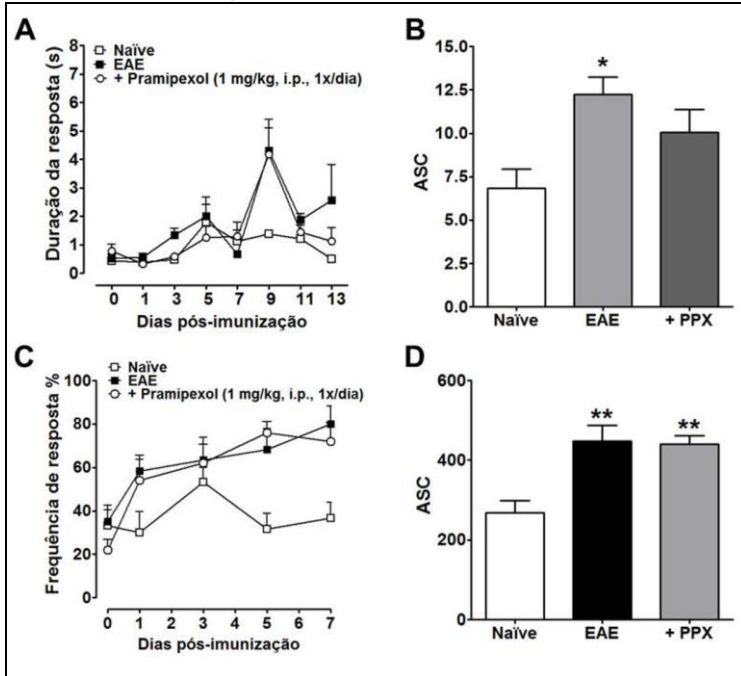


Os animais foram tratados com PPX (PPX) nas doses de 0,1 e 1 mg/kg (i.p. 1x/dia) durante 0 - 40 dias p.i. – tratamento preventivo. (A) Escore clínico médio, com sua respectiva (B) área sob a curva (ASC); (C) variação de peso corporal e (D) retas de ganho de peso na fase de indução de EAE (até 16º dia). ANOVA de uma via, seguida de teste *post-hoc* de Newmann-Keuls, * $p < 0,05$ grupo Naïve versus EAE, *** $p < 0,001$ grupo Naïve versus EAE e PPX 1 mg/kg, #### $p < 0,001$.

3.4.3. Efeito do PPX na algia induzida pela EAE

Dados recentes demonstraram que a dor crônica afeta entre 50 – 80% dos pacientes com EM, sendo este sintoma de extrema relevância clínica (SVENDSEN *et al.*, 2003). Assim, o próximo objetivo do estudo foi avaliar o efeito anti-hiperalgésico do PPX durante a fase pré-motora da EAE. Conforme ilustrado na Figura 12, a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela EAE foram caracterizadas pelo aumento evidente e prolongado na duração (Figura 12A e B) e frequência (Figura 12C e D) de resposta, respectivamente. A ANOVA de uma via da área sob a curva para o teste da acetona apresentou um $F_{(2, 14)} = 5,290$ e $p < 0,05$, e para o teste de Von Frey um $F_{(2, 14)} = 10,10$ e $p < 0,01$. A hiperalgesia térmica foi evidente a partir do 3º dia p.i., atingiu o pico máximo de resposta no dia 9 e permaneceu elevada durante os 13 dias de análise (Figura 12A e B), enquanto que a hiperalgesia mecânica tornou-se evidente a partir do 1º dia p.i., com pico máximo no 7º dia p.i. (Figura 12C e D). O tratamento preventivo dos animais com PPX na dose de 1 mg/kg não foi capaz de inibir a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela EAE.

Figura 12. Efeito do tratamento preventivo com PPX na algemia induzida pela EAE.



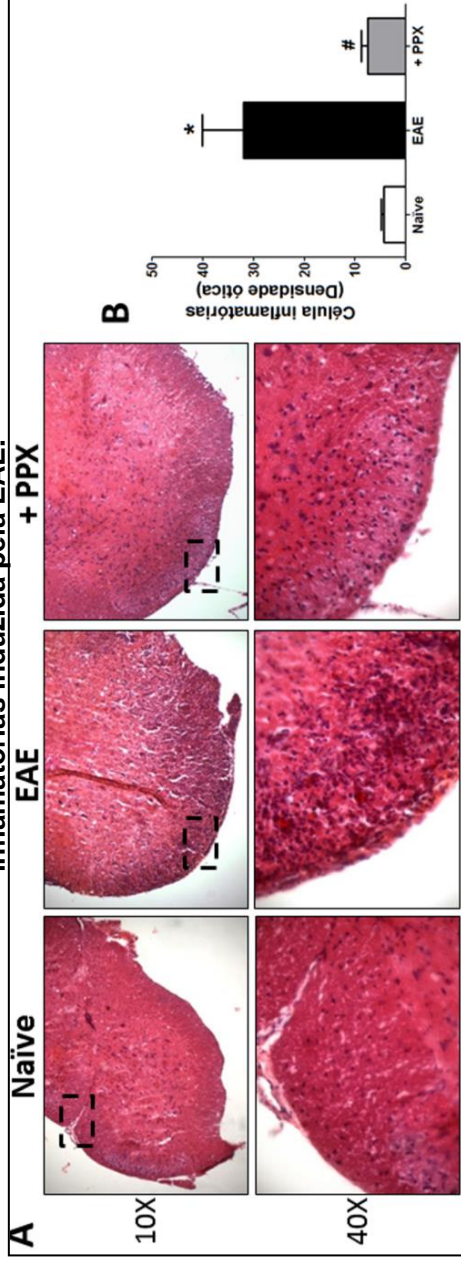
O tratamento com o PPX não inibiu a hiperalgisia e alodinia induzida pela EAE. (A e B) Análise do efeito anti-hiperalgésico do PPX na alodinia térmica ao frio, e (C e D) hipersensibilidade mecânica. Os dados são apresentados como média \pm EPM (N = 5 - 8 animais/grupo). ANOVA de uma via, seguida de teste *post-hoc* de Newmann-Keuls, * $p < 0,05$ grupo Naive versus EAE, ** $p < 0,01$ grupo Naive versus EAE e PPX 1 mg/kg.

3.4.4. Efeito do PPX na neuroinflamação no modelo da EAE

A patogênese da EM inclui a infiltração de macrófagos e linfócitos T encefalitogênicos para o SNC, assim como a ativação de células gliais residentes, especialmente, astrócitos e microglia, as quais em conjunto induzem a morte de oligodendrócitos, a desmielinização e, conseqüentemente, o dano axonal (BJARTMAR *et al.*, 2003; MCFARLAND e MARTIN, 2007). Por esta razão, a próxima etapa deste trabalho foi avaliar

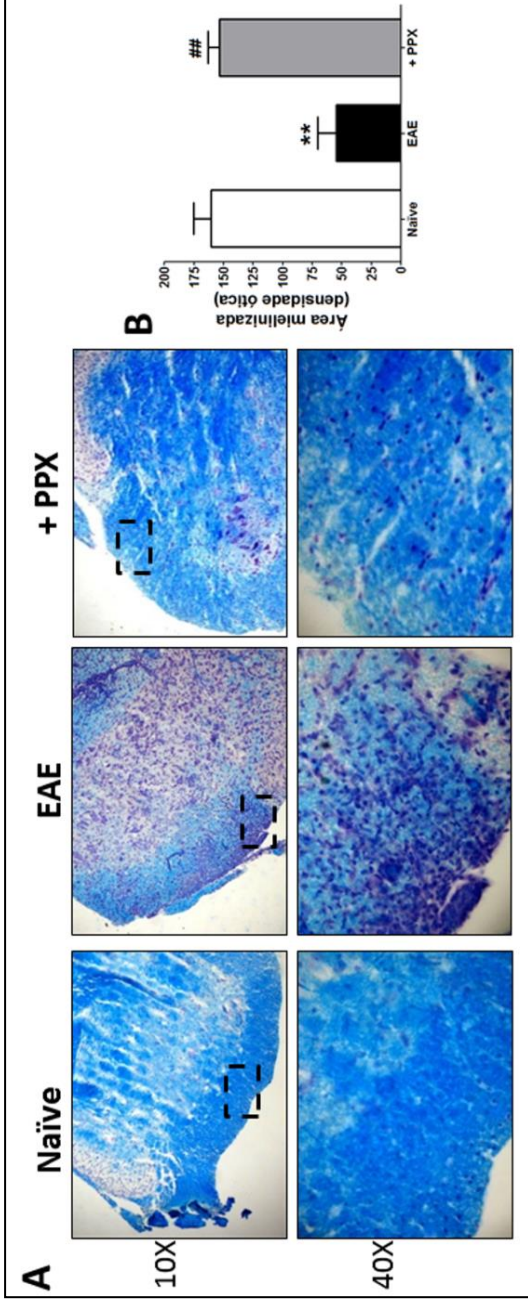
o potencial do PPX em inibir o desenvolvimento da resposta neuroinflamatória, assim como a desmielinização na medula espinhal dos animais após a indução da EAE. Conforme ilustrado na Figura 13, as análises histológicas da medula espinhal dos animais naíve apresentam níveis muito discretos de células inflamatórias (Figura 13A e B), com ausência de área de desmielinização (Figura 14A e B) e reduzida ativação astrocitária (Figura 15A e B). No entanto, após 40 dias de imunização, os animais do grupo EAE apresentaram significativa infiltração de células inflamatórias na medula espinhal (Figura 13), acompanhado de significativa desmielinização na substância branca da medula espinhal (Figura 14) e ativação astrocitária (Figura 15). De forma significativa, o tratamento com PPX (1 mg/kg, i.p., 1x/dia) ao longo do protocolo de EAE reduziu a resposta neuroinflamatória (Figura 13A e B), área de desmielinização (Figura 14A e B) e a ativação de astrócitos (Figura 15A e B) no 40º dia p.i., quando comparado com os animais do grupo EAE. A análise da área sob a curva através da ANOVA de uma via resultou em um $F_{(2, 10)} = 7,947$ e $p < 0,01$ para a infiltração celular, um $F_{(2, 8)} = 32,23$ e $p < 0,001$ para os níveis de GFAP, e um $F_{(2, 6)} = 18,88$ e $p < 0,01$ para a desmielinização.

Figura 13. Efeito do tratamento preventivo com PPX na infiltração de células inflamatórias induzida pela EAE.



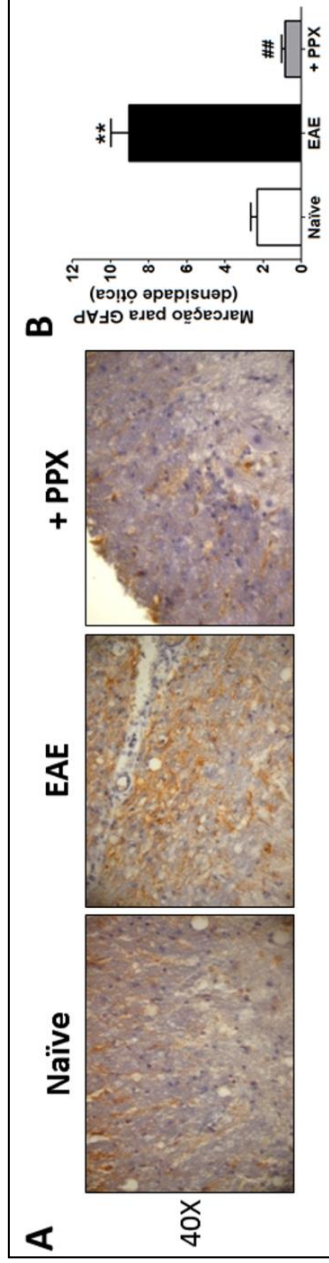
Os animais foram imunizados com a mistura do peptídeo MOG35–55/CFA e toxina pertussis, e tratado com o PPX do dia 0 ao dia 40 pós-imunização. (A) Figuras representativas dos campos analisados. (B) densidade óptica, com o programa ImajeJ, de células inflamatórias na medula espinal dos animais do grupo naïve, EAE e tratado com PPX – PPX – 1 mg/kg, i.p., 1x/dia, do dia 0 ao dia 40 p.i. A quantificação foi baseada na média de 4-5 campos oculares da substância branca da medula espinal de um total de 4-5 animais/grupo. Aumento de 100 e 400x, respectivamente. ANOVA de uma via, seguida de teste *post-hoc* de Newman-Keuls, * $p < 0,05$ grupo EAE versus naïve e # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ grupo PPX versus EAE.

Figura 14. Efeito do tratamento preventivo com PPX na desmielinização induzida pela EAE.



Os animais foram imunizados com a mistura do peptídeo MOG35–55/CFA e toxina pertussis, e tratado com o PPX do dia 0 ao dia 40 pós-imunização. (A) Figuras representativas dos campos analisados. (B) Figuras representativas dos campos analisados, e (B) análise por densidade ótica, com o programa ImageJ, da área de desmielinização na medula espinal dos animais do grupo naïve, EAE e tratado com PPX – PPX – 1 mg/kg, i.p., 1x/dia, dia 0 ao dia 40 p.i. A quantificação foi baseada na média de 4-5 campos oculares da substância branca da medula espinal de um total de 4-5 animais/grupo. Aumento de 100 e 400x, respectivamente. ANOVA de uma via, seguida de teste *post-hoc* de Newmann-Keuls, * $p < 0,05$ versus naïve e # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ grupo PPX versus EAE.

Figura 15. Efeito do tratamento preventivo com PPX na ativação astrocitária induzida pela EAE.

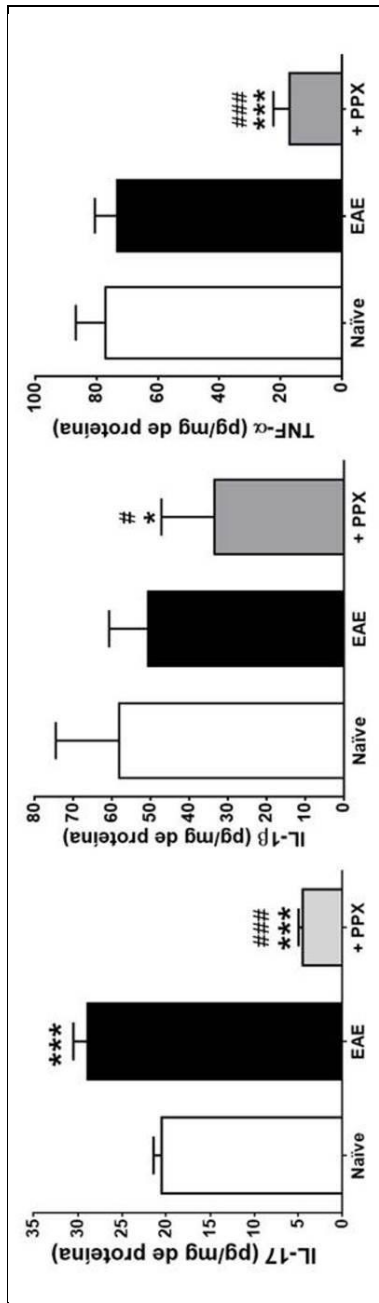


Os animais foram imunizados com a mistura do peptídeo MOG35–55/CFA e toxina pertussis, e tratado com o PPX do dia 0 ao dia 40 pós-imunização. (A) Figuras representativas dos campos analisados. (A) Figuras representativas dos campos analisados, (B) análise por densidade ótica, com o programa ImageJ, da marcação para GFAP na medula espinal dos animais do grupo naïve, EAE e tratado com PPX – 1 mg/kg, i.p., 1x/dia, dia 0 ao dia 40 p.i. A quantificação foi baseada na média de 4-5 campos oculares da substância branca da medula espinal de um total de 4-5 animais/grupo. Aumento de 400x. ANOVA de uma via, seguida de teste *post-hoc* de Newmann-Keuls, * $p < 0,05$ grupo EAE versus naïve e $^{##}p < 0,01$ grupo PPX versus EAE.

3.4.5. Efeito do PPX no sistema imune periférico

Dentre as citocinas envolvidas na patogênese da EM, estudos prévios demonstram forte associação da IL-17 à gravidade da doença (MCFARLAND e MARTIN, 2007). Assim, o próximo objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do PPX sobre a produção de IL-17 em linfonodos após indução da EAE. Os resultados da Figura 16 indicam aumento significativo no conteúdo de IL-17 nos linfonodos inguinais do grupo EAE, quando comparado ao grupo naïve. De forma significativa, o tratamento preventivo com PPX (1 mg/kg, i.p.) inibiu significativamente o aumento dos níveis de IL-17 após a indução EAE (Figura 16). Embora, durante a fase crônica da EAE não tenha ocorrido aumento de IL-1 β ou TNF- α , o PPX também induziu uma redução significativa nos níveis basais destas citocinas (Figura 16). As análises dos resultados através da ANOVAS de uma via apresetaram um $F_{(2, 14)} = 144,1$ e $p < 0,001$ para IL-17, um $F_{(2, 14)} = 4,644$ e $p < 0,05$ para IL-1 β , e um $F_{(2, 13)} = 18,85$ e $p < 0,001$ para o TNF- α .

Figura 16. Efeito do tratamento preventivo com PPX nos níveis de citocina pró-inflamatórias nos órgãos linfóides periféricos após o aparecimento dos sinais clínicos da EAE.

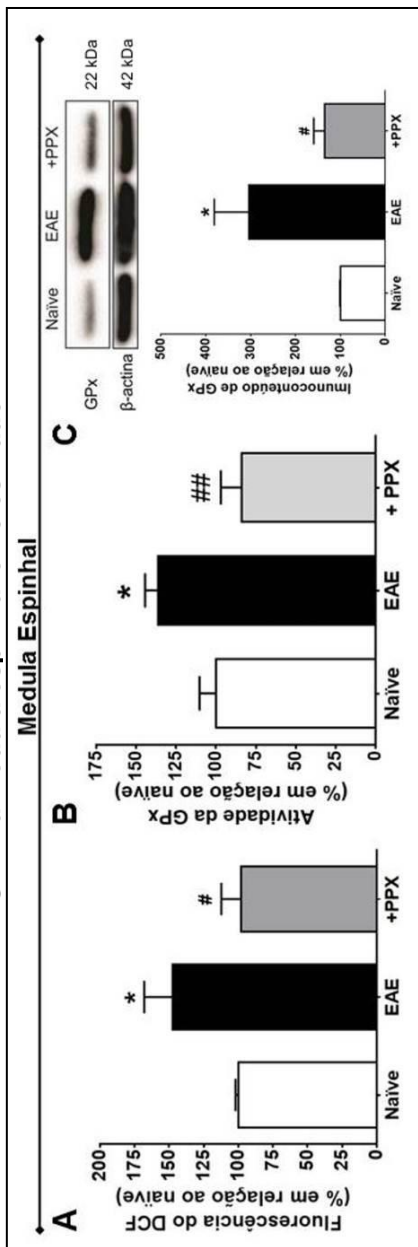


Análise dos níveis de IL-17, IL-1β e TNF-α por ELISA nos linfonodos inguinais dos animais naïve, EAE e EAE + PPX 1 mg/kg (i.p.), 40 dias p.i. Os dados são apresentados como média ± EPM (N = 5 - 8 animais/grupo). ANOVA de uma via, seguida de teste *post-hoc* de Newmann-Keuls, * p < 0,05 grupo Naïve versus + PPX, *** p < 0,001 grupo Naïve versus EAE e +PPX, ### p < 0,001 grupo + PPX versus EAE.

3.4.6. Efeito do PPX na modulação redox dos animais induzidos com a EAE

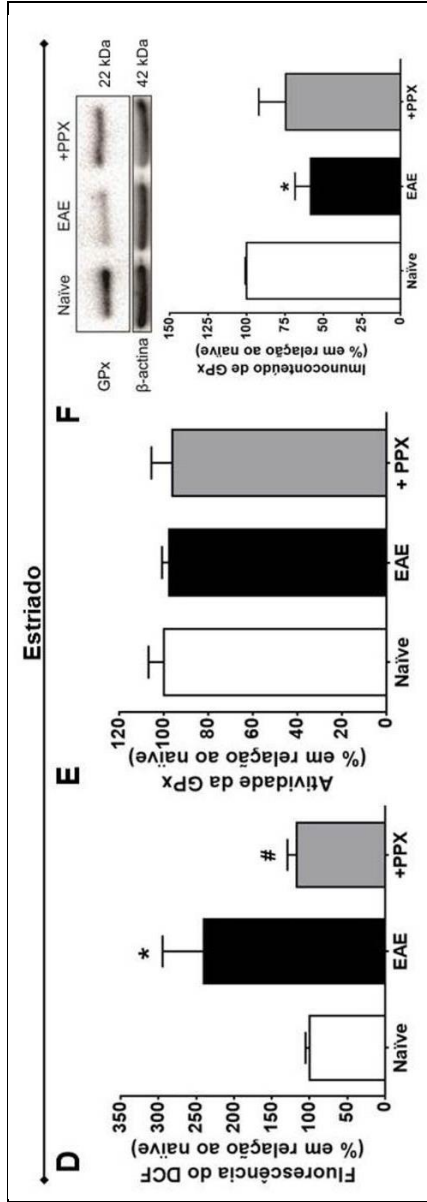
As ERO desempenham um papel importante tanto na esclerose múltipla quanto em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, assim como no modelo da EAE (GILGUN-SHERKI, MELAMED e OFFEN, 2004; DIAS, JUNN e MOURADIAN, 2013). Desta forma, investigou-se alterações nos níveis de espécies reativas utilizada a sonda H_2DCFDA e nas defesas antioxidantes, mais especificamente a enzima GPx sobre a qual ainda não há estudos no modelo da EAE. Para obtenção destes resultados foi feita a análise da atividade e expressão da enzima GPx e a produção de espécies reativas em homogenatos de estriado e medula espinhal. Quarenta dias após a indução da EAE, a produção de ERO estava aumentada tanto na medula espinhal (Figura 17A), quanto no estriado (Figura 17D). A análise da fluorescência do DCF através da ANOVA de uma via revelou um $F_{(2, 15)} = 4,338$ e $p < 0,05$ na medula, e um $F_{(2, 11)} = 4,901$ e $p < 0,05$ no estriado. Uma observação interessante é que na medula espinhal, o tratamento com o PPX restaurou a atividade da GPx (Figura 17B) e sua expressão (Figura 17C) à níveis basais, enquanto que não teve efeito no estriado (Figura 17E e F). Os resultados da atividade GPx foram avaliados através da ANOVA de uma via revelando um $F_{(2, 14)} = 7,589$ e $p < 0,01$ na medula, e um $F_{(2, 11)} = 3,143$ e $p > 0,05$ no estriado. Os resultados das densidades ópticas das bandas de GPx também foram analisados através da ANOVA de uma via apresentando um $F_{(2, 13)} = 4,576$ e $p < 0,05$ na medula, e um $F_{(2, 13)} = 3,873$ e $p < 0,05$ no estriado.

Figura 17. Efeitos do PPX na produção de ERO, imunoconteúdo de GPx e atividade da GPx na medula espinhal e no estriado.



Continua...

Continuação

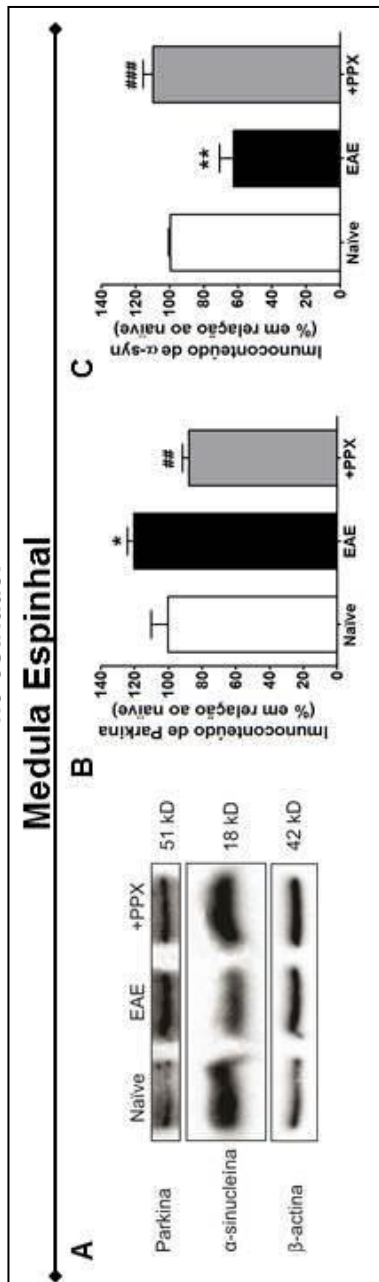


Os camundongos foram eutanasiados no 40° dia pós-indução da EAE, os homogenatos dos tecidos foram usados para medida da produção ERO através da sonda H₂DCFDA na medula espinal (A) e estriado (D). Análise da atividade GPx na medula espinal (B) e no estriado (E). Análises das densidades óticas das bandas marcadas para GPx, com suas respectivas figuras representativas para amedula espinal (C) e noestriado (F). As barras representam a média \pm EPM de seis a nove animais/grupo. ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Newman-Keuls mostrou efeito significativo para: * $p < 0,05$ comparado aos animais Naive; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ comparado aos animais EAE.

3.4.7. Efeito do PPX nas proteínas parkina e α -sinucleína dos animais induzidos com a EAE

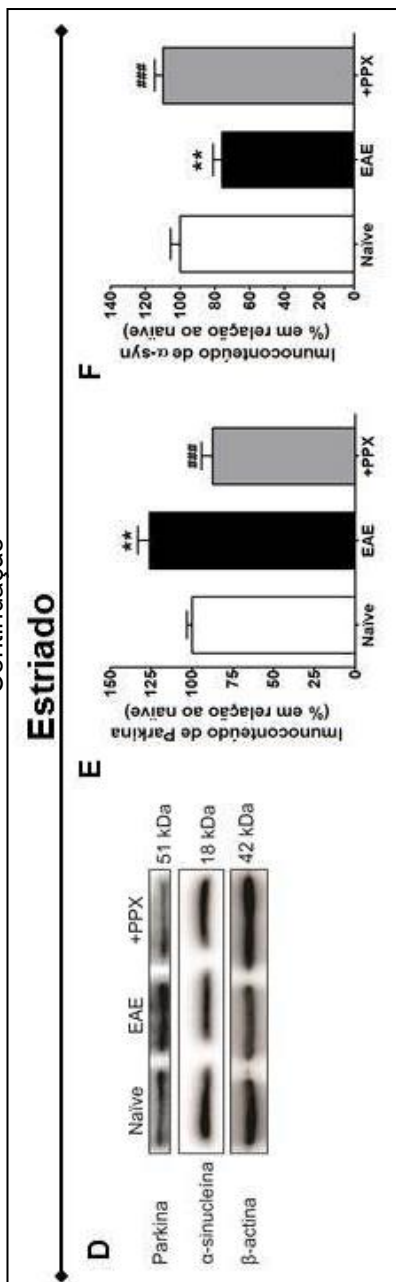
Embora a atividade inflamatória seja uma parte importante no desenvolvimento da EM (GRIGORIADIS e VAN PESCH, 2015), outros mecanismos podem estar contribuindo para sua patogênese (LU *et al.*, 2009; WITTE *et al.*, 2009). Particularmente, mecanismos envolvidos em outras doenças neurodegenerativas, como os níveis de parkina e α -sinucleína. Um estudo prévio demonstrou que os níveis de parkina estavam aumentados em lesões inflamatórias cerebrais de pacientes com EM (WITTE *et al.*, 2009). Além disso, evidências sugerem que α -sinucleína teria níveis aumentados tanto no cérebro de pacientes quanto no modelo da EAE em ratos (PAPADOPOULOS *et al.*, 2006). Desta forma, para determinar o papel do PPX no desenvolvimento da EAE, analisou-se o imunoconteúdo de parkina e da α -sinucleína na medula espinhal e no estriado de camundongos. O tratamento preventivo com o PPX aboliu o efeito da EAE, levando a expressão da parkina aos seus níveis basais na medula espinhal (Figura 18A e B) e no estriado (18D e E). Da mesma forma, as alterações na expressão da parkina induzidas pela EAE foram revertidas pelo tratamento com PPX na medula espinhal (Figura 18A e B) e no estriado (Figura 18D e E), voltando aos níveis basais. As análises da densidade óptica de parkina através da ANOVA de uma via apresentaram um $F_{(2, 15)} = 9,087$ e $p < 0,01$ na medula, e um $F_{(2, 26)} = 9,821$ e $p < 0,001$ no estriado. Como mostrado na Figura 18 durante a fase crônica da EAE houve uma redução do imunoconteúdo de α -syn, tanto na medula espinhal (Figura 18A e C), como no estriado (Figura 18D e F). As alterações na expressão da α -syn induzidas pela EAE foram revertidas pelo tratamento com PPX na medula espinhal (Figura 18A e C) e no estriado (Figura 18D e F), voltando aos níveis basais. A ANOVA de uma via para a densidade óptica de α -syn revelou um $F_{(2, 10)} = 16,31$ e $p < 0,001$ na medula, e um $F_{(2, 15)} = 11,44$ e $p < 0,001$ no estriado.

Figura 18. Efeitos do PPX no imunoconteúdo de parkina e α -sinucleína na medula espinhal e no estriado.



Continua...

Continuação



O tratamento preventivo com o PPX inibiu as alterações nos níveis de parkina e α -sinucleína induzidas pela EAE. Bandas representativas da imunomarcção de parkina e α -sinucleína na (A) medula espinal e (D) estriado, e análise semi-quantitativa das densidades óticas marcadas para parkina (B) na medula espinal e (E) no estriado, α -sinucleína (C) na medula espinal e (F) no estriado. Animais EAE foram tratados com PPX 1 mg/kg/dia ou veículo, i.p., do dia 0 ao dia 40 p.i. e eutanasiados ao final do 40º dia. Os valores representam a média \pm EPM de seis a nove animais/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparados ao grupo Naive; ; # $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparados ao grupo EAE pela ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls.

3.4.1. Efeito do tratamento agudo e repetido com PPX no comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS

Baseado nos resultados prévios, os quais mostraram que o PPX aboliu completamente os déficits motores e as alterações nos marcadores inflamatórios, no modelo da encefalomielite autoimune experimental com o uso do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, testou-se a possibilidade do PPX (1 mg/kg) prevenir as alterações em parâmetros inflamatórios e o comportamento tipo-depressivo induzido por uma única injeção de LPS, um modelo inflamatório de depressão. Uma única administração de PPX (1 mg/kg, i.p.), 60 minutos antes da exposição ao LPS, não preveniu o efeito tipo-depressivo induzido pelo LPS no TNF (Figura 19A). A análise estatística através da ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o grupo LPS ($F_{(1,37)} = 14,7$; $p < 0,001$), mas não para o grupo tratado com PPX ($F_{(1,37)} = 0,82$; $p > 0,05$), ou na interação LPS x PPX ($F_{(1,37)} = 0,10$; $p > 0,05$).

O comportamento tipo-anedônico foi analisado através do *splash test* pelo registro do tempo total de autolimpeza durante um período de 5 minutos (Figura 19B). A análise estatística através da ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo no tempo total de autolimpeza do grupo LPS ($F_{(1,44)} = 5,00$; $p < 0,05$), mas não para o PPX ($F_{(1,44)} = 1,08$; $p > 0,05$), ou a interação entre PPX x LPS ($F_{(1,44)} = 0,17$; $p > 0,05$). O autocuidado foi estimado pela latência para iniciar a autolimpeza (Figura 19C). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo na latência para iniciar a autolimpeza nos animais tratados com LPS ($F_{(1,37)} = 4,67$; $p < 0,05$), enquanto que o PPX não apresentou efeito ($F_{(1,37)} = 0,01$; $p > 0,05$), e o efeito da interação LPS x PPX não foi observado ($F_{(1,37)} = 0,04$; $p > 0,05$).

A atividade motora foi analisada através do TCA (Figura 19D). A ANOVA de duas vias detectou um efeito para o LPS no TCA ($F_{(1,53)} = 7,06$; $p < 0,05$), mas não para o tratamento com PPX ($F_{(1,53)} = 0,15$; $p > 0,05$), ou para a interação LPS x PPX ($F_{(1,53)} = 0,003$; $p > 0,05$).

A administração repetida com o PPX por 7 dias preveniu completamente o comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS no TNF (Figura 19E). Esse resultado foi confirmado pela ANOVA de duas vias a qual mostrou efeito significativo para o LPS ($F_{(1,44)} = 20,19$; $p < 0,001$), o tratamento com PPX ($F_{(1,44)} =$

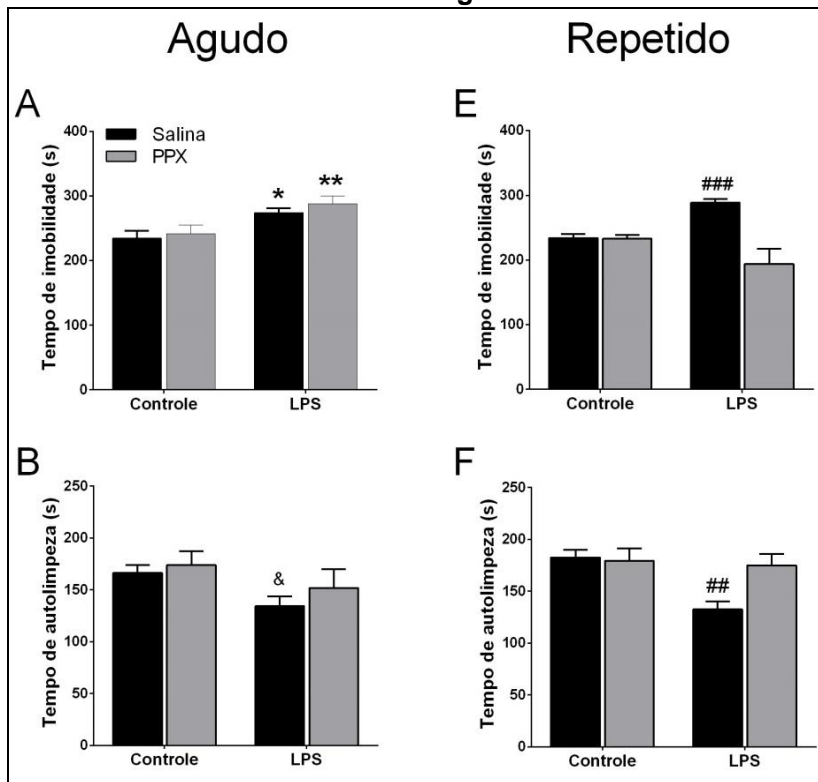
17,65; $p < 0,001$), e a interação LPS x PPX ($F_{(1,44)} = 7,81$; $p < 0,01$).

O tratamento com o PPX por 7 dias também preveniu a diminuição no tempo de autolimpeza induzida pelo LPS no *splash test* (Figura 19F). A ANOVA de duas vias mostrou que o LPS interferiu com o tempo de autolimpeza ($F_{(1,78)} = 7,86$; $p < 0,01$), bem como o pré-tratamento com o PPX ($F_{(1,78)} = 6,33$; $p < 0,05$), mas não houve interação LPS x PPX ($F_{(1,78)} = 3,28$; $p = 0,07$).

De acordo com os resultados prévios de anedonia, o teste *post hoc* detectou um aumento na latência para iniciar a autolimpeza no grupo LPS, um indicativo de comprometimento do comportamento de autocuidado, o qual não foi observado nos animais que receberam o PPX por sete dias (Figura 19G). Entretanto, a ANOVA de duas vias mostrou que o LPS não teve efeito na latência para iniciar a autolimpeza ($F_{(1,31)} = 1,7$; $p > 0,05$), mas o tratamento com PPX teve efeito ($F_{(1,31)} = 7,97$; $p < 0,05$), e uma tendência para a interação LPS x PPX ($F_{(1,31)} = 4,03$; $p = 0,053$).

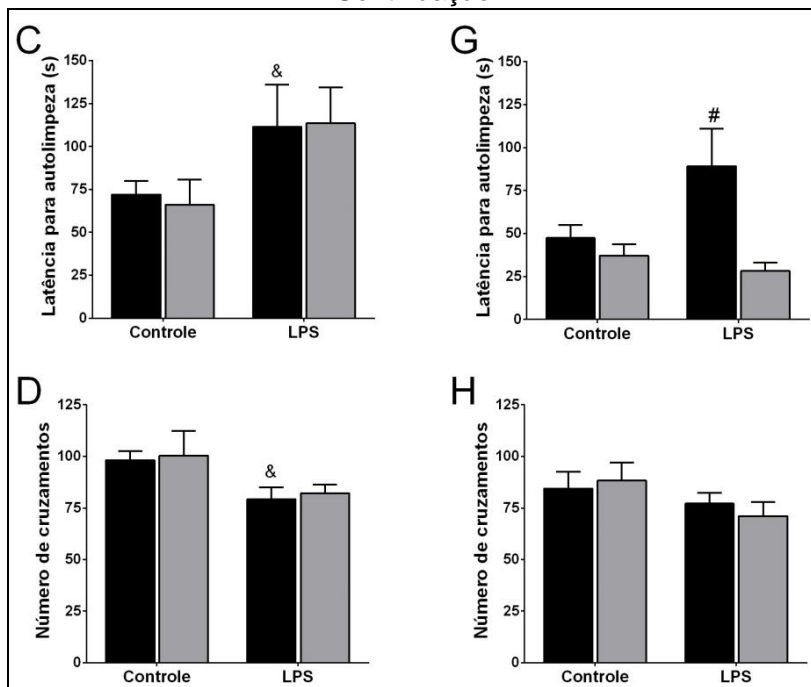
A atividade locomotora no TCA foi semelhante entre os grupos LPS e o PPX mais LPS, sugerindo que o efeito do PPX no TNF não pode ser atribuído a um aumento na atividade locomotora (Figura 19H). A ANOVA de duas vias da atividade locomotora revelou um efeito para o PPX ($F_{(1,53)} = 4,97$; $p < 0,05$), mas não para o grupo LPS ($F_{(1,53)} = 1,90$; $p > 0,05$), ou para a interação LPS x PPX ($F_{(1,53)} = 0,01$; $p > 0,05$).

Figura 19. Efeitos dos tratamentos agudo e repetido do PPX no comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS em camundongos.



Continua...

Continuação



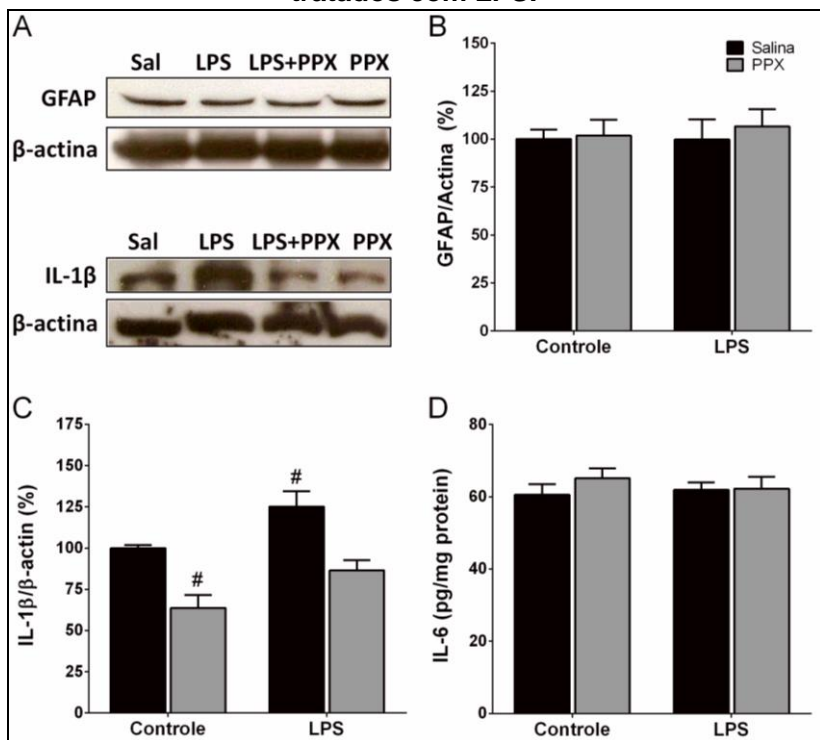
Os camundongos receberam uma única injeção de PPX (1 mg/kg; i.p.) (A-D) ou repetidamente por 7 dias (E-H), antes de uma única administração de LPS (0,1 mg/kg). Vinte e quatro horas depois da injeção de LPS, os testes comportamentais foram realizados: (A, E) tempo de imobilidade no teste do nado forçado, (B, F), tempo de autolimpeza no *splash test*, (C, G) latência para iniciar a autolimpeza, e (D, H) atividade locomotora no teste do campo aberto. Os dados estão representados como média \pm EPM de 6-10 camundongos/grupo. As diferenças entre os grupos são indicadas por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparados ao grupo controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparados aos outros grupos; e & indica que o LPS foi um fator significativo na ANOVA de duas vias.

3.4.1. Efeito do tratamento repetido com PPX nos parâmetros relacionados à inflamação

Em seguida, foram realizadas análises para determinar se o tratamento por sete dias com o PPX poderia prevenir os parâmetros inflamatórios induzidos pelo LPS. O tratamento *per se* com o PPX foi capaz de diminuir o imunoconteúdo de IL-1 β , enquanto que a exposição ao LPS produz um aumento nos níveis de IL-1 β no hipocampo de camundongos (Figura 20A, painel inferior e 20C). O tratamento com o PPX por sete dias preveniu o aumento nos níveis de IL-1 β hipocampal induzido pelo LPS, sendo que os valores médios desta citocina permaneceram em níveis basais. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo para o grupo LPS ($F_{(1,18)} = 13,38$; $p < 0,01$), para o tratamento com PPX ($F_{(1,18)} = 32,89$; $p < 0,001$), mas não para a interação LPS x PPX ($F_{(1,18)} = 0,04$; $p > 0,05$). Nenhum dos tratamentos com LPS, PPX, ou a combinação de ambos foram capazes de alterar os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 (Figura 20D). Isso foi evidenciado pela análise dos dados através da ANOVA de duas vias, a qual apresentou os resultados de ($F_{(1,20)} = 0,77$; $p > 0,05$) para o LPS, ($F_{(1,20)} = 0,07$; $p > 0,05$) para o PPX e ($F_{(1,20)} = 0,57$; $p > 0,05$) para a interação LPS x PPX.

A proliferação e ativação astrocitária podem ser observadas em processos neuroinflamatórios. Entretanto, o tratamento com LPS não alterou o imunoconteúdo de GFAP no hipocampo 24 horas após o tratamento com LPS (Figura 20A, painel superior). Os tratamentos somente com PPX ou em combinação com o LPS também não foram capazes de alterar os níveis de GFAP no hipocampo dos camundongos (Figura 20A, painel superior e 20B).

Figura 20. Efeito do tratamento repetido com o PPX sobre os níveis de IL-1 β , GFAP e IL-6 no hipocampo de camundongos tratados com LPS.

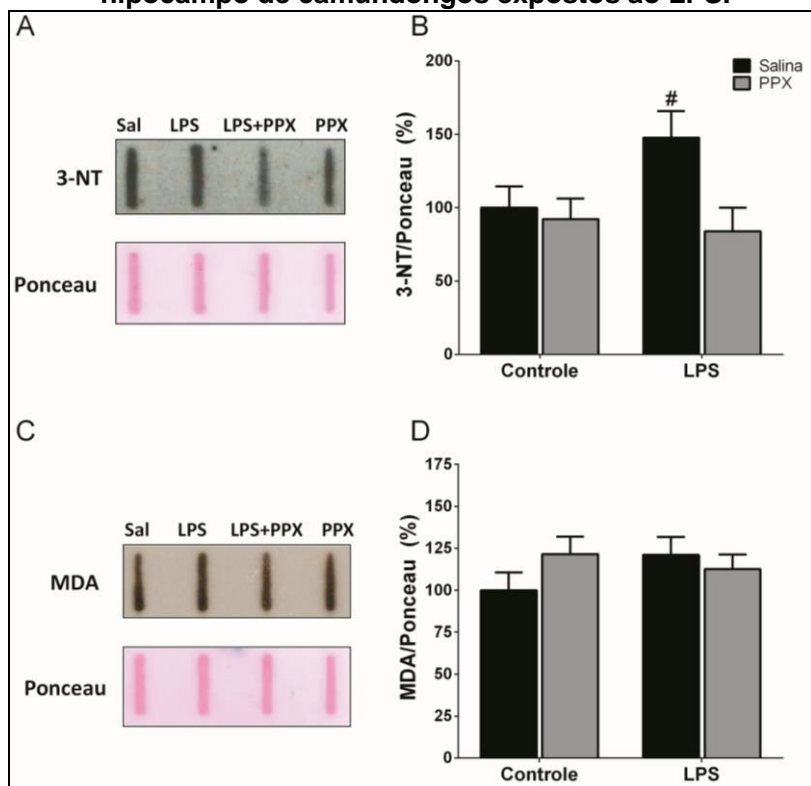


(A) Figuras representativas dos blots mostrando o conteúdo relativo de IL-1 β (painel superior) ou GFAP (painel inferior), (B) porcentagem da alteração de IL-1 β em relação à β -actina, e (C) IL-6 quantificado por ELISA. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. As diferenças significativas entre todos os grupos são identificadas por # $p < 0.05$.

Como previamente mencionado, em condições inflamatórias, é frequentemente encontrado o estresse oxidativo e nitrosativo (SCHLICHTER *et al.*, 2010; BAI *et al.*, 2015). Então, para determinar a presença destes parâmetros, foram analisados os níveis de 3-NT e MDA no hipocampo, onde foram encontrados níveis aumentados de 3-NT pelo tratamento com LPS (Figura 21A e B), uma alteração que foi prevenida pelo tratamento repetido com o PPX. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito

significativo para o tratamento com o PPX ($F_{(1,37)} = 5,15$; $p < 0,05$), mas não para o LPS ($F_{(1,37)} = 1,57$; $p > 0,05$), ou para a interação LPS x PPX ($F_{(1,37)} = 3,17$; $p > 0,05$). Por outro lado, o estresse oxidativo não pôde ser observado em nenhum grupo, como observado pelos níveis inalterados de adutos proteicos de MDA (Figura 21C e D).

Figura 21. Efeito do tratamento repetido com PPX nos marcadores de estresse oxidativos e nitrosativo no hipocampo de camundongos expostos ao LPS.

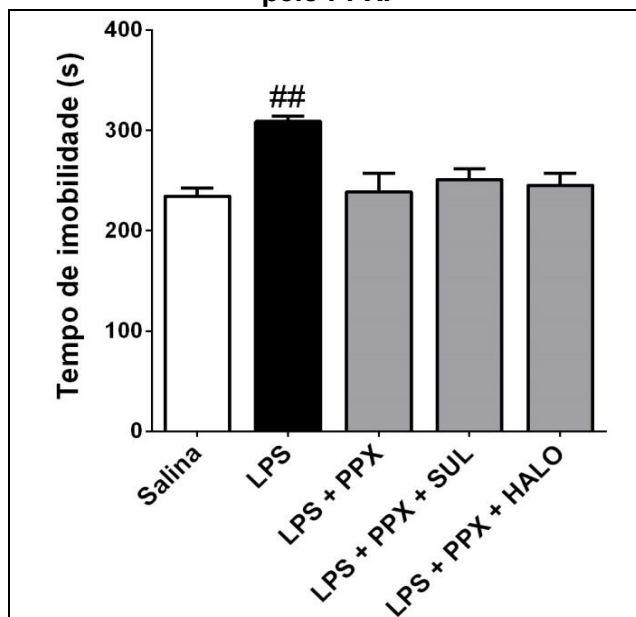


(A) Figuras representativas do slot blot mostrando o conteúdo relativo de MDA e (B) de proteínas modificadas com a 3-nitro tirosina (3-NT), e (C) Porcentagem de alteração na 3-NT em relação à coloração com Ponceau-S. Os dados são representados como média \pm EPM de 10-11 camundongos por grupo. Diferença significativa entre todos os demais grupos são identificadas por [#] $p < 0.05$.

3.4.1. Estudo farmacológico da ação do PPX no comportamento tipo-depressivo

Com o objetivo de investigar o papel dos receptores dopaminérgicos no efeito tipo-antidepressivo do PPX, administrou-se diariamente durante 7 dias o haloperidol, um antagonista não-seletivo de receptores de dopamina, ou a sulpirida, um antagonista de D2R/D3R meia hora antes de cada aplicação do PPX. Uma hora depois da última administração do PPX, o LPS foi injetado e 24 horas depois foram realizados os experimentos comportamentais. Foi observado um efeito significativo através da ANOVA de uma via ($p < 0.001$). O teste *post hoc* mostrou que o grupo LPS era diferente de todos os outros grupos ($p < 0.001$) (Figura 22). Esse resultado indica que nem a sulpirida ou o haloperidol não foram capazes de impedir o efeito tipo-antidepressivo do PPX nos animais expostos ao LPS no tempo de imobilidade no TNF.

Figura 22. Análise da ativação de receptores de dopamina pelo PPX.

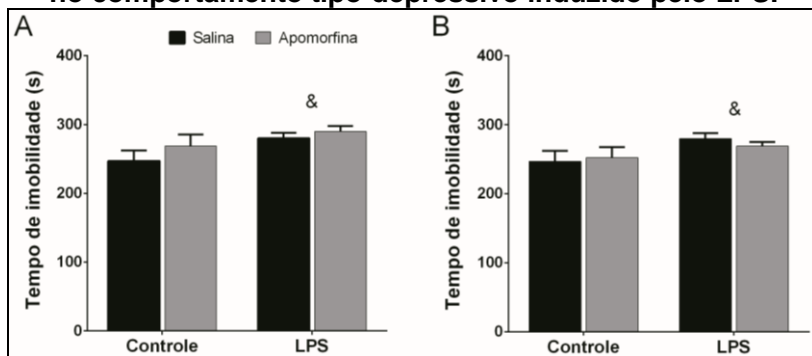


A sulpirida (50 mg/kg, i.p.) ou o haloperidol (0,2 mg/kg, i.p.) foram injetados diariamente 30 min antes da administração do PPX (1 mg/kg) por 7 dias. Os camundongos foram tratados com LPS (0,1 mg/kg, i.p.) 60 minutos depois da última administração com PPX e 24 horas depois submetidos ao TNF. ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa para ^{##}p < 0,01 quando comparado aos outros grupos.

Uma vez que os antagonistas de receptores dopaminérgicos não foram efetivos em reverter o efeito do PPX, optou-se por testar se a apomorfina, um agonista D2R (MISSALE *et al.*, 1998), poderia prevenir o efeito tipo-depressivo induzido pelo LPS, assim como fez o PPX, um agonista seletivo para os receptores de D2R/D3R. A apomorfina (50 µg/kg, i.p.) foi administrada 60 min antes da injeção de LPS, ou administrada por 7 dias consecutivos, sendo a última aplicação uma hora antes do LPS. Vinte e quatro horas depois da injeção de LPS, os animais foram testados no TNF e no TCA. O tratamento agudo com a apomorfina não foi capaz de reverter o aumento no tempo de imobilidade induzido pelo LPS no TNF (Figura 23A). A

ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo para o tratamento com LPS ($F_{(1,26)} = 4,53$; $p < 0,05$), mas não para a apomorfina ($F_{(1,28)} = 1,55$; $p > 0,05$), ou para a interação LPS x apomorfina ($F_{(1,28)} = 0,64$; $p > 0,05$). O tratamento repetido com apomorfina também foi ineficaz em reverter o aumento na imobilidade induzida pelo LPS no TNF (Figura 23C). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo para o LPS ($F_{(1,28)} = 8,17$; $p < 0,05$), mas não para a apomorfina ($F_{(1,28)} = 0,02$; $p > 0,05$), ou para a interação LPS x apomorfina ($F_{(1,28)} = 1,84$; $p > 0,05$). Os tratamentos com apomorfina, LPS ou com a combinação de ambos não alteraram a atividade locomotora no TCA (dados não mostrados).

Figura 23. Análise do papel dos receptores de dopamina D2 no comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS.



(A) Os camundongos foram tratados com uma única injeção de apomorfina (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) 60 min antes da administração do LPS. (B) Os camundongos foram tratados por 7 dias com apomorfina (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.), sendo a última dose aplicada 60 min antes da injeção de LPS. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 7-8 camundongos por grupo. &Indica que o LPS foi um fator significativo na ANOVA de duas vias.

3.5. Discussão

Por apresentar manifestações neurológicas decorrentes de um mecanismo autoimune, como modelo de EM, a EAE segue o mesmo princípio. Por este motivo, as alterações no sistema imune têm sido extensivamente estudadas. Na década de 1980 foi observada a presença de receptores dopaminérgicos em células apresentadoras de antígeno e células T, bem como tirosina hidroxilase e síntese de dopamina (LEVITE, 2015). Esses receptores são expressos e ativados diferentemente durante as doenças autoimunes. Como exemplo, foi observado em linfócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (uma doença autoimune na qual ocorre destruição dos tecidos de conexão) um aumento na expressão de D2R (JAFARI *et al.*, 2013). Interessantemente, um estudo demonstrou que, nos linfócitos de pacientes com EM e tratados com IFN- β , ocorreu uma redução na expressão dos D3R em células mononucleares sanguíneas (GIORELLI, LIVREA e TROJANO, 2005). Por outro lado, as CD possuem uma baixa expressão D2R e D3R em comparação aos linfócitos (GIORELLI *et al.*, 2005). Esses achados sugerem que a dopamina pode ter um papel chave em regulação da diferenciação e proliferação dos linfócitos. Ainda, a ativação destes receptores pode induzir respostas antagônicas, enquanto a ativação de D2R reduz a sobrevivência dos linfócitos T, a ativação de D1R/D5R suprime as células T regulatórias (PACHECO *et al.*, 2014). Apesar de todo conhecimento na área, poucos estudos investigaram a ação de agonistas dopaminérgicos durante condições neuroinflamatórias autoimunes.

O PPX tem sido usado para tratar a DP, uma doença neurológica marcada por: (i) reduzida transmissão dopaminérgica, o que está ligado à morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra (RIEDERER e WUKETICH, 1976); (ii) alterações na expressão de receptores dopaminérgicos no estriado, bem como em células mononucleares (DONNAN *et al.*, 1991; NAGAI *et al.*, 1996; BARBANTI *et al.*, 1999); (iii) acúmulo anormal de α -sinucleína, conhecido como corpos de Lewy. Interessantemente, alterações específicas na expressão de receptores de dopamina que foram observadas nos linfócitos obtidos de pacientes com a doença de Parkinson, também foram observadas nos linfócitos de pacientes com EM (PACHECO *et*

al., 2014). Em conjunto, esses estudos sugerem que os receptores dopaminérgicos podem contribuir para o desenvolvimento da resposta autoimune. Os resultados observados neste estudo indicam pela primeira vez, que o PPX impediu por completo o aparecimento das disfunções motoras clássicas observadas em camundongos com EAE. Nem uma única disfunção motora foi observada entre o início do tratamento e o fim do experimento, 40 dias após o início da imunização. As evidências obtidas neste trabalho sugerem que o efeito protetor do PPX ocorra através da imunomodulação, uma vez que o tratamento com este composto inibiu a infiltração de células inflamatórias e a ativação astrocitária no SNC. Ainda, o tratamento com PPX diminuiu a resposta imune no tecido linfóide periférico. Além disto, reestabeleceu os níveis basais as ERO e de GPx, e restaurou os níveis de parkina e α -sinucleína, tanto no estriado quanto na medula espinhal. Por outro lado, o tratamento com o PPX não preveniu a aparecimento dos sintomas sensoriais relacionados a dor induzidos pela EAE, embora os efeitos analgésicos de outros agonistas de D2R já tenham sido demonstrados (TAYLOR, JOSHI e UPPAL, 2003; ALMANZA *et al.*, 2015).

Em conjunto, os resultados apresentados confirmam e estendem os estudos conduzidos por Dijkstra *et al.* (DIJKSTRA *et al.*, 1994), os quais demonstram que a bromocriptina, um agonista D2R, reduziu tanto a gravidade, quanto a duração dos sinais agudos e crônicos observados na EAE. É conhecido que essas manifestações da EAE e que se assemelham aos sintomas observados em pacientes com EM, são o resultado da infiltração multifocal de células imunes no SNC. Os mediadores químicos secretados, bem como ataque direto de células específicas do sistema imune, danificam a bainha de mielina dos axônios. A perda progressiva da bainha de mielina pode ser observada através da coloração com Luxol Fast Blue, um marcador clássico de lipídios e de desmielinização. A mielina foi preservada até 40 dias após o início da imunização, refletindo na ausência de sintomas motores. Neste trabalho, o PPX também reduziu a quimiotaxia de células inflamatórias, processo que atrai células para dentro da medula espinhal de camundongos nos quais a EAE foi induzida, diferentemente do observado em camundongos EAE não tratados. Ainda, o aumento na expressão de GFAP é outro parâmetro comumente identificado na patologia

da EAE, bem como na EM e em outras patologias neuroinflamatórias (BANNERMAN *et al.*, 2007). Quando ativados, os astrócitos podem desencadear a ativação de vias que levam a toxicidade, contribuindo para a indução de neuropatologias (WILLIAMS, PIATON e LUBETZKI, 2007). Como demonstram os resultados, o tratamento com o PPX também preveniu a astrogliose reativa na medula espinhal. Isso pôde ser observado através da análise dos níveis de GFAP, mostrando que os animais tratados com o PPX não apresentaram aumento na quantidade desta proteína em comparação aos camundongos induzidos pela EAE. Um importante ativador astrocitário é o IFN- γ (DAGINAKATTE *et al.*, 2008a), uma citocina pró-inflamatória e produzida principalmente por células Th1 e Th17 (DUHEN *et al.*, 2013), as quais estão envolvidas na patogênese da EAE e da EM. A ativação astrogliar pode ser mediada, não apenas por citocinas, mas também através do aumento e manutenção dos níveis de adenosina monofosfato cíclica, ou AMPc (DUHEN *et al.*, 2013). Os receptores de D2R ativam a via da proteína G inibitória/G_o, reduzindo o AMPc (BEAULIEU *et al.*, 2004). Os dados obtidos confirmam as informações da literatura, uma vez que o tratamento preventivo com o PPX inibiu significativamente o desenvolvimento da EAE, associado ainda com a redução da síntese de GFAP na medula espinhal. Para que o processo de inflamação seja iniciado no SNC, é necessário que células Th17 sejam ativadas por APC, que por sua vez, apresentam epítomos de mielina (ou que apresentam reatividade cruzada). Após serem ativadas, as células Th17 migram até o SNC, onde podem ser reativadas por APC que apresentam antígenos próprios, sendo reativados principalmente pela micróglia.

A análise da ativação de D1R ou D5R mostrou que esses receptores aumentaram a produção de IL-17, sugerindo um aumento na proliferação de células Th17 (NAKANO *et al.*, 2008; PRADO *et al.*, 2012), entretanto não há estudos referentes à ativação de D2R e seus efeitos nos níveis de IL-17. Assim, investigou-se a possibilidade de que o tratamento com o agonista de receptores dopaminérgicos D2/D3 possa inibir a resposta imune em tecidos linfóides periféricos, no modelo de EM (EAE) em camundongos. Os resultados obtidos sugerem que a ativação de receptores D2, durante a fase de indução da EAE, preveniu de forma significativa a resposta imune adaptativa e inata nos linfonodos por diminuir IL-1 β e TNF- α , enquanto que a ativação

de D3R seria responsável por diminuir os níveis de IL-17. Assim, confirma-se e complementa-se os estudos conduzidos por Hanami *et al.* (2013), no qual o PPX reduziu os níveis de AMPc, bem como a expressão de mRNA dos fatores de transcrição pró-inflamatórios c-Fos e NFATc1, em células humanas precursoras de osteoclastos (HANAMI *et al.*, 2013). Embora não tenha sido possível observar uma alteração nos níveis de IL-1 β nos linfócitos dos animais EAE, o tratamento com PPX produziu uma redução significativa nos níveis basais desta citocina. Esse fato sugere que o efeito protetor do PPX pode ser devido à ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D2 em células APC. Ainda, dando suporte a esta hipótese, um estudo prévio com o modelo da EAE, demonstrou que camundongos apresentaram um comportamento tipo-depressivo (GENTILE *et al.*, 2015), o qual está associado ao aumento de IL-1 β e redução da liberação de dopamina no estriado. Além disso, estudos prévios mostraram que os níveis de TNF- α só estavam aumentados na periferia durante a indução da EAE ou durante o surgimento do primeiro sintoma clínico. Estes dados sugerem que os níveis desta citocina possam não ser importantes para a manutenção da EAE, mas sim para o seu desenvolvimento (ZORZELLA-PEZAVENTO *et al.*, 2013; HIDAKA *et al.*, 2014). Interessantemente, camundongos tratados com bromocriptina ou quinpirol, dois agonistas de receptores D2/D3, também reduziram os níveis de TNF- α no soro, após a administração da toxina bacteriana LPS (HASKO *et al.*, 1996; MASTRONARDI, YU e MCCANN, 2001). Desta forma, é possível que os efeitos imunomodulatórios e neuroprotetores do PPX durante o desenvolvimento da EAE estejam relacionados com a inibição da ativação e proliferação periférica de células Th-17 (menores níveis de IL-17). Esse evento pode ser devido a uma modulação da resposta imune inata nos órgãos linfoides periféricos, entretanto, experimentos futuros serão necessários para confirmar esta hipótese.

Apesar de já ter sido observado que não há desmielinização na matéria cinzenta profunda de animais EAE (FJAER *et al.*, 2015), foram encontrados níveis aumentados de IL-1 β (GENTILE *et al.*, 2015). Essa interleucina é capaz de desencadear a morte neuronal (ROSSI *et al.*, 2014) e a desregulação dopaminérgica no estriado de animais EAE (GENTILE *et al.*, 2015). Além disso, o estriado faz parte da rede de comunicação entre a substância negra e o córtex motor

(CAVALLARI *et al.*, 2014). Uma vez que o PPX é utilizado no tratamento da doença de Parkinson, também foram avaliados parâmetros relacionados com esta patologia. O aumento no perfil das citocinas, observado durante na EM e na EAE, é capaz de ativar as células do sistema imune como os macrófagos/neutrófilos, os quais são responsáveis pela fagocitose, produção e liberação de ERO (MARCHI *et al.*, 2014). Interessantemente, foi observado aumento nos níveis de ERO, no líquido cérebro espinhal e sangue de pacientes com EM (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2004), no líquido e cérebro de indivíduos com DP (DIAS *et al.*, 2013) e no cérebro e nas lesões medulares na EAE (HE *et al.*, 2013). Os resultados obtidos mostram que houve aumento nos níveis de ERO na medula espinhal e no estriado dos animais EAE, mas não nos animais tratados com PPX. Em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), que são células tipo-neuronais, o PPX apresentou propriedades antioxidantes (FERRARI-TONINELLI *et al.*, 2010), as quais estão de acordo com a fluorescência normal do DCF em animais tratados com o PPX. Também foram observados níveis de GPx aumentados na medula espinhal e reduzidos no estriado de animais EAE. Até o presente momento não há trabalhos mostrando esse efeito de alteração nos níveis de GPx ou nas respostas adaptativas em animais tratados com o PPX. Entretanto, já foi observado aumento nos níveis da proteína GPx no fluido cérebro-espinhal de ratos EAE (ROSENLING *et al.*, 2012), o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. Não obstante, ainda são necessários mais experimentos para compreender as vias de sinalização envolvidas nas alterações nos níveis de GPx no SNC de animais EAE.

A parkina é uma proteína amplamente estudada na DP (HAMPE *et al.*, 2006), embora ainda exista escassez de informações a respeito do efeito do PPX na expressão desta proteína. A parkina é uma E3-ubiquitina ligase, responsável por poliubiquitinar proteínas malformadas e danificadas, marcando-as para serem degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (WITTE *et al.*, 2009). Enquanto que o sistema ubiquitina-proteassoma é necessário para remover proteínas danificadas e malformadas, ele também possui um papel na apresentação de antígenos (BASLER *et al.*, 2014). Além disso, inibidores proteassomais foram capazes de melhorar os sintomas da EAE

(BASLER *et al.*, 2014). Somente um estudo mostrou o aumento de parkina no cérebro de pacientes *post mortem* com EM (WITTE *et al.*, 2009). Neste estudo, foi observado que a EAE induz um aumento significativo na expressão de parkina na medula espinhal e no estriado. Isso indica que o processo neuroinflamatório autoimune da EAE é capaz de alterar os níveis de parkina e dá suporte aos achados prévios que também demonstraram aumento de parkina em pacientes com EM (WITTE *et al.*, 2009). Adicionalmente, a indução da parkina durante a DP pode ser interpretada como uma tentativa de remover proteínas mutadas, agregadas, e malformadas, como a α -syn (PETRUCCELLI *et al.*, 2002; GEORGE *et al.*, 2010).

Embora a α -syn seja uma proteína intracelular, já foi encontrada no fluido cérebro-espinhal de pacientes com EM (WANG *et al.*, 2012). Ainda, a neurodegeneração que ocorre na DP e em outras sinucleinopatias, foi associada com a agregação da α -syn (LEE e TROJANOWSKI, 2006). Os resultados mostram que o tratamento com PPX preveniu a diminuição da α -syn na medula espinhal e no estriado dos animais EAE. Não obstante, a α -syn foi substancialmente aumentada nas células neuronais e gliais da medula espinhal de pacientes, quando analisadas *post mortem* em pacientes com EM e em animais EAE, particularmente durante a exacerbação dos sintomas (PAPADOPOULOS *et al.*, 2006). Entretanto, os resultados obtidos durante este trabalho, mostraram redução nos níveis de α -syn na medula espinhal. Estes resultados estão de acordo com um trabalho prévio no qual foi demonstrada a redução nos níveis desta proteína em pacientes com EM (ANTONELOU *et al.*, 2015). Assim, o acompanhamento dos níveis de α -syn durante o desenvolvimento da EM ou na EAE pode ser relevante. Com relação a isto, o modelo de EAE utilizado mimetiza a EM progressiva primária, enquanto outros modelos de EAE mimetizam a EM surto-remissão (STROMNES e GOVERMAN, 2006). Além disso, a α -syn é degradada pelo sistema ubiquitina-proteassoma (EBRAHIMI-FAKHARI *et al.*, 2011), o qual tem sua função aumentada em pacientes com EM e animais EAE (BELLAVISTA *et al.*, 2014). Portanto, esses achados estão de acordo com outros trabalhos que mostraram aumento nos níveis de parkina, uma E3-ubiquitin ligase, o qual pode levar a um aumento na degradação da α -syn pelo proteassoma, levando desta forma a uma diminuição dos níveis desta proteína.

Em resumo, os dados apresentados demonstram que o tratamento preventivo com o PPX inibiu o desenvolvimento e a progressão dos sinais motores da EAE por: a) inibição da infiltração de células inflamatórias no SNC, b) redução da área desmielinizada, c) limitar a ativação astrogliar, d) reestabelecer os níveis de produção de ERO, e e) restaurar aos níveis basais as proteínas GPx, parkina, e α -syn. Em conjunto, os dados indicam que a atividade anti-inflamatória, aliada à modulação dos níveis de parkina e α -syn, é um potencial mecanismo de ação do PPX em impedir o desenvolvimento dos sintomas da EAE em camundongos. Entretanto é necessário que este composto seja aplicado após o surgimento dos sintomas iniciais para definir a utilidade deste como agente protetor na EM. Porém, se comprovada sua eficácia isto trará avanços significativos para as pesquisas básicas e clínicas. Finalmente, o uso de um agonista de receptores de dopamina D2/3 aumenta o embasamento acerca da participação dos receptores dopaminérgicos em doenças inflamatórias, e que agonistas destes receptores podem se tornar uma nova monoterapia ou, então, utilizado em combinação com outros fármacos já existentes para o tratamento de EM.

O TDM é comumente observado em pacientes com doenças neuroinflamatórias (GENTILE *et al.*, 2015; MCCUTCHEON *et al.*, 2016), incluindo a EM (TURNER *et al.*, 2016), e em indivíduos em tratamento imunoterápico com citocinas (CAPURON e DANTZER, 2003). Não obstante, estudos sugerem que infecções periféricas podem induzir o aparecimento de TDM, assim, um achado interessante foi feito pela observação de que voluntários saudáveis desafiados com o LPS tiveram intensificação na incidência de sintomas de TDM (DELLAGIOIA e HANNESTAD, 2010; SLAVICH e IRWIN, 2014a). Além disso, o comportamento tipo-depressivo pode ser observado em roedores, quando modelos inflamatórios são utilizados, como sepse e ligação parcial do nervo isquiático (BRUNING *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016), bem como através da injeção de LPS via intraperitoneal (ANDRE *et al.*, 2008; MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). Sabe-se que duas horas após a administração de uma dose relativamente baixa do LPS (~0,1 mg/kg, i.p.) os níveis de mRNA de várias citocinas estão aumentados no hipocampo de camundongos, incluindo a IL-1 β e a IL-6 (SKELLY *et al.*, 2013). O comportamento tipo-doente pode ser observado nas primeiras 6

horas, e o comportamento tipo-depressivo após 24 horas da administração do LPS (FRENOIS *et al.*, 2007). Neste trabalho, os experimentos reproduziram os resultados publicados previamente mostrando que a injeção de uma única dose de LPS pode produzir o comportamento tipo depressivo no TNF e o comportamento anedônico no *splash test* (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013; FARZI *et al.*, 2015). Ainda, no presente estudo o efeito tipo-depressivo induzido pelo LPS foi abolido pelo tratamento com o PPX no TNF e no *splash test*. Este último tem uma abordagem similar ao teste da preferência pela sacarose, analisando a redução da palatabilidade da solução de sacarose, mas com o benefício adicional de permitir a análise do autocuidado pela medida da latência para iniciar a autolimpeza. O LPS induziu um aumento na latência para iniciar a autolimpeza a qual foi reestabelecida pelo tratamento com o PPX.

Como demonstrado previamente, foi observado que o tratamento por um longo período de tempo com o PPX, um agonista D2R/D3R, preveniu o aparecimento de alterações neurológicas e reduziu a inflamação no modelo da EAE em camundongos. Os dados aqui apresentados reforçam a ideia de que o PPX possui ação anti-inflamatória, uma vez que ele foi capaz de prevenir o aumento de IL-1 β e 3-NT no hipocampo. Estes resultados sugerem fortemente que o PPX é um potente supressor dos processos neuroinflamatórios quando utilizados em tratamentos repetidos (FARBOOD *et al.*, 2015a). Corroborando com esta ideia, o PPX administrado repetidamente por 7 dias foi efetivo em prevenir as alterações comportamentais induzidas pelo desafio com LPS, incluindo o aumento na imobilidade no TNF, redução do tempo total e latência para iniciar a autolimpeza no *splash test*. Por outro lado, este efeito tipo-antidepressivo não foi observado com a administração de uma única dose uma hora antes da exposição ao LPS, sugerido que o PPX não possui um efeito agudo em inibir diretamente a resposta inflamatória.

Interessantemente, já foi demonstrado que o tratamento agudo com o PPX (1-3 mg/kg, i.p.) apresentou um efeito tipo-antidepressivo no TNF (OSTADHADI *et al.*, 2016). Estes dados contrastam com a ineficácia do tratamento agudo com o PPX (1 mg/kg, i.p.) em reverter o aumento no tempo de imobilidade no TNF, o aumento na latência e a redução no tempo de autolimpeza no *splash test* induzidos pelo LPS. Camundongos

machos NMRI com 11-13 semanas de idade (OSTADHADI *et al.*, 2016), ou, no presente estudo, camundongos fêmeas Swiss (60-120 dias de idade) foram usados nos estudos. Assim, os resultados conflitantes ainda necessitam de novas investigações antes de uma conclusão, a qual não faz parte dos objetivos deste trabalho. Além disso, foi demonstrado que o efeito agudo tipo-antidepressivo do PPX foi abolido pelo haloperidol (0,15 mg/kg, i.p.) e pelo tratamento com sulpirida (5 mg/kg, i.p.) (OSTADHADI *et al.*, 2016). Neste trabalho, o tratamento repetido (30 minutos antes do PPX, diariamente por 7 dias) com haloperidol (0,2 mg/kg, i.p.) ou sulpirida (50 mg/kg, i.p.) foram incapazes de reverter o efeito tipo-antidepressivo do PPX nos camundongos tratados com LPS, sugerindo que os efeitos tipo-antidepressivos do PPX nos camundongos desafiados com LPS ocorrem por um mecanismo independente da ativação de receptores de dopamina. Esse resultado possui suporte na abordagem farmacológica na qual a ativação dos D2R foi incapaz de abolir o comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS, uma vez que a administração aguda ou repetida da apomorfina não alterou o aumento da imobilidade induzida pelo LPS no TNF. Estes dados sugerem que a ação tipo-antidepressiva do PPX não esteja relacionada a ativação dos D2R. Não obstante, mais experimentos são necessários para descartar esta possibilidade.

As citocinas encontradas no SNC podem estar aumentadas sob condições neuroinflamatórias, as quais podem ser relacionadas com o comportamento tipo-depressivo (POLLAK e YIRMIYA, 2002; MAES, SONG e YIRMIYA, 2012). Embora os níveis de IL-6 não estivessem aumentados 24 horas após o tratamento com o LPS, outros (FRUHAUF *et al.*, 2015; HASEGAWA-ISHII *et al.*, 2016b) mostraram que o aumento de IL-6 ocorreu somente 4 horas após doses mais elevadas de LPS (0,25 e 3 mg/kg), sendo este aumento não mais observado após 24 horas. Apesar de nossos resultados indicarem que o tratamento com LPS não induz o aumento de IL-6, não há como descartar a possibilidade de que esta interleucina esteja aumentada em outro tempo. Também é sugerido que a IL-1 β é essencial para o desenvolvimento do comportamento tipo-depressivo em modelos de depressão induzidos pelo estresse crônico (KOO e DUMAN, 2008). Ainda, a administração i.c.v. de IL-1 β *per se* pode induzir o comportamento tipo-depressivo (KOO e DUMAN, 2008). Os experimentos deste trabalho mostraram

que os animais tratados somente com o PPX por 7 dias tiveram uma redução nos níveis de IL-1 β no hipocampo. Neste sentido, o tratamento preventivo com PPX durante o desenvolvimento da EAE também foi capaz de diminuir os níveis basais de IL-1 β no hipocampo. No modelo de EAE, o PPX, além de prevenir os déficits neurológicos e o aumento de marcadores inflamatórios na medula, também foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β nos linfonodos de camundongos nos quais foi induzido a EAE. Além disso, o aumento na expressão de IL-1 β , que estava aumentado no hipocampo de camundongos tratados 24 h antes com LPS, foi prevenido com o tratamento repetido com PPX.

Em condições neuroinflamatórias, citocinas pró-inflamatórias induzem a ativação astrocitária (DAGINAKATTE *et al.*, 2008b). Já foi demonstrada em camundongos a indução de astrogliose após o desafio com LPS 0,16 e 0,63 mg/kg (BIESMANS *et al.*, 2013). Embora o tratamento com LPS (0,16 mg/kg) tenha dobrado a expressão de GFAP após 6 h, seus valores retornaram a níveis basais após 24 horas (BIESMANS *et al.*, 2013). Isso está de acordo com os resultados obtidos, que não mostraram nenhuma alteração no imunocontéudo de GFAP no hipocampo de animais tratados com LPS ou PPX, com análises sendo efetuadas 24 h após a exposição ao LPS. Ainda, reforçando estes resultados, outro trabalho mostrou que o LPS foi capaz de ativar a neuroinflamação sem induzir astrogliose (O'CALLAGHAN *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo e nitrosativo são normalmente observados no cérebro de camundongos tratados com LPS (ABDEL-SALAM *et al.*, 2014). O LPS (0,2 mg/kg) induziu níveis elevados de MDA 4 horas após o tratamento (ABDEL-SALAM *et al.*, 2014), mas nossos resultados apresentaram níveis inalterados de adutos proteína-MDA. Interessantemente, Li *et al.* (LI *et al.*, 2015) também não conseguiram observar alterações nos níveis de MDA 24 horas após a exposição de camundongos ao LPS.

Demonstrou-se que o PPX preveniu o aumento nos níveis de 3-NT, um marcador da ativação da óxido nítrico sintase (AHN *et al.*, 1999), induzidos pela administração de LPS e que estão normalmente associados com processos inflamatórios. Esse resultado está de acordo com os achados recentes que mostram que há aumento nos níveis de IL-1 β após a administração de LPS, uma vez que esta citocina é conhecida por induzir a

expressão da iNOS em macrófagos e micróglia (KAUSHIK *et al.*, 2013). Além disso, já foi demonstrado que o receptor de glutamato NMDA participa no efeito tipo-antidepressivo do PPX (OSTADHADI *et al.*, 2016). Uma vez que o LPS induz a ativação dos receptores NMDA, o efeito supracitado do PPX sobre estes receptores pode estar relacionado com seu mecanismo preventivo neste modelo. A ativação dos receptores NMDA causa um aumento na produção de óxido nítrico, sugerindo que este pode ser um importante mecanismo de atuação do LPS, e está relacionado com a ativação de eventos neuroinflamatórios e do comportamento tipo-depressivo (MILLER e RAISON, 2016). Em conjunto, estes resultados nos permitem especular que o efeito antidepressivo do PPX pode ser devido a sua capacidade de contrabalancear as vias inflamatórias ativadas pelo LPS e que levam a produção de IL-1 β e produção de 3-NT.

3.6. Conclusões

No primeiro quadro experimental, os resultados parciais obtidos corroboram e estendem o conhecimento acerca das inter-relações entre a EM com a DP, especialmente, no imunoconteúdo das proteínas parkina e α -syn no SNC, nas diferentes fases de desenvolvimento da EAE. Ressalta-se que, durante a progressão do tratamento e com a indução da resposta neuroinflamatória, os níveis de α -syn correlacionam-se inversamente com aqueles da parkina e diretamente com a expressão de GPx. A indução da parkina sugere que há um aumento substancial da atividade proteossomal durante o decurso temporal da EAE. Também sugerem um papel antioxidante protetor para a GPx, nesse mesmo modelo. Assim, acredita-se que o aumento dessas proteínas no SNC, após a indução da EAE, seja um mecanismo compensatório para controlar os níveis ERO. Por fim, os nossos dados sugerem que a ativação dos receptores D2/D3 dopaminérgicos, durante a fase de indução da EAE, bloqueia o desenvolvimento da doença relacionada a neuroinflamação e a desmielinização. Também foi possível demonstrar que o PPX por diminuir a expansão/ativação e/ou proliferação de linfócitos pró-encefalitogênicos, restaurou o imunoconteúdo das proteínas parkina, α -syn e GPx, especialmente, na medula espinhal.

Já no segundo quadro experimental, a administração periférica de LPS levou a um comportamento tipo-depressivo em camundongos. A administração de PPX, um agonista de receptores de D2R/D3R, preveniu o desenvolvimento do comportamento tipo-depressivo no TNF, e o comportamento anedônico no *splash test*. A exposição ao LPS levou ao aumento dos marcadores neuroinflamatórios IL-1 β e 3-NT, sendo este efeito abolido pelo tratamento repetido com o PPX. Os antagonistas de receptores dopaminérgicos (haloperidol ou sulpirida) foram incapazes de reverter o efeito tipo-antidepressivo do PPX; além disso, um agonista de D2R (apomorfina) não teve efeito tipo-antidepressivo em camundongos expostos ao LPS. Embora os receptores de dopamina tenham sido associados a uma atividade imunomodulatória, os resultados obtidos indicam que o efeito tipo-antidepressivo do PPX, no modelo do LPS, pode não estar relacionado à ativação dos D2R.

O PPX foi capaz de impedir o surgimento dos sintomas induzidos pela EAE e pelo LPS. Os efeitos do PPX foram acompanhados da redução de parâmetros inflamatórios, sugerindo que este composto tenha uma ação imunomodulatória. Embora estudos tenham mostrado a presença de receptores dopaminérgicos e a modulação de receptores específicos tenham a capacidade de induzir ou inibir a inflamação, os efeitos do PPX no modelo do LPS não foram revertidos pelos antagonistas de receptores de dopamina. Assim, é possível que o efeito imunomodulatório do PPX seja independente da ativação de receptores dopaminérgicos. Finalmente, mais estudos são necessários para determinar o mecanismo pelo qual o PPX inibe a ativação dos eventos inflamatórios. A determinação desses mecanismos poderá definir novos alvos terapêuticos e novos compostos para tratar doenças neuroinflamatórias.

Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. ISBN 9788535247442.

ABDEL-SALAM, O. M. *et al.* . Citric acid effects on brain and liver oxidative stress in lipopolysaccharide-treated mice. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 5, p. 588-598, 2014.

ABRAMOVA, N. A. *et al.* . Inhibition by R(+) or S(-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma. **Journal of neuroscience research**, v. 67, n. 4, p. 494-500, 2002.

AHN, B. *et al.* . Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 7, p. 1337-1344, 1999.

AL-HAKEIM, H. K.; AL-RAMMAHI, D. A.; AL-DUJAILI, A. H. IL-6, IL-18, sIL-2R, and TNFalpha proinflammatory markers in depression and schizophrenia patients who are free of overt inflammation. **Journal of affective disorders**, v. 182, p. 106-14, 2015.

AL-HARBI, K. S. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. **Patient preference and adherence**, v. 6, p. 369-388, 2012.

AL-OMAISHI, J.; BASHIR, R.; GENDELMAN, H. E. The cellular immunology of multiple sclerosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 65, n. 4, p. 444-52, 1999.

ALLEN, A. T. *et al.* . Coexpressed D1- and D2-like dopamine receptors antagonistically modulate acetylcholine release in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 188, n. 3, p. 579-90, 2011.

ALMANZA, A. *et al.* . A D2-like receptor family agonist produces analgesia in mechanonociception but not in thermonociception at the spinal cord level in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 137, p. 119-25, 2015.

ANDRE, C. *et al.* . Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. **Journal of neuroimmunology**, v. 200, n. 1-2, p. 90-99, 2008.

ANTONELOU, R. *et al.* . Decreased levels of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. **Journal of neurochemistry**, v. 134, n. 4, p. 748-55, 2015.

ARAKI, R. *et al.* . Kamikihito Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behavior via Attenuating Neural Activation, but Not Inflammation, in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and Central Nucleus of the Amygdala in Mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 39, n. 2, p. 289-294, 2016.

ASCHBACHER, K. *et al.* . Maintenance of a positive outlook during acute stress protects against pro-inflammatory reactivity and future depressive symptoms. **Brain, behavior, and immunity**, v. 26, n. 2, p. 346-52, 2012.

AYALA, A.; MUNOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 360438, 2014.

BAI, L. *et al.* . Somatostatin prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra by inhibiting the activation of microglia. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 1, p. 1002-8, 2015.

BANNERMAN, P. *et al.* . Astrogliosis in EAE spinal cord: derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia. **Glia**, v. 55, n. 1, p. 57-64, 2007.

BARBANTI, P. *et al.* . Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 14, n. 5, p. 764-71, 1999.

BASDEO, S. A. *et al.* . Polyfunctional, Pathogenic CD161+ Th17 Lineage Cells Are Resistant to Regulatory T Cell-Mediated

Suppression in the Context of Autoimmunity. **Journal of immunology**, v. 195, n. 2, p. 528-40, 2015.

BASLER, M. *et al.* . Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. **EMBO molecular medicine**, v. 6, n. 2, p. 226-38, 2014.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 1, p. 182-217, 2011.

BEAULIEU, J. M. *et al.* . Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 5099-104, 2004.

BELLAVISTA, E. *et al.* . Current understanding on the role of standard and immunoproteasomes in inflammatory/immunological pathways of multiple sclerosis. **Autoimmune diseases**, v. 2014, p. 739705, 2014.

BENNETT, J. *et al.* . Safety and Tolerability of R(+) Pramipexole in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 49, n. 4, p. 1179-87, 2015.

BERGHAUZEN-MACIEJEWSKA, K. *et al.* . Pramipexole but not imipramine or fluoxetine reverses the "depressive-like" behaviour in a rat model of preclinical stages of Parkinson's disease. **Behavioural brain research**, v. 271, p. 343-353, 2014.

BERGHAUZEN-MACIEJEWSKA, K. *et al.* . Alterations of BDNF and trkB mRNA expression in the 6-hydroxydopamine-induced model of preclinical stages of Parkinson's disease: an influence of chronic pramipexole in rats. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0117698, 2015.

BERRIOS, G. E. Melancholia and depression during the 19th century: a conceptual history. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 153, p. 298-304, 1988.

BIESMANS, S. *et al.* . Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 271359, 2013.

BINDA, C. *et al.* . Crystal structures of monoamine oxidase B in complex with four inhibitors of the N-propargylaminoindan class. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1767-74, 2004.

BJORKHOLM, C.; MONTEGGIA, L. M. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 72-79, 2015.

BOCCHIO-CHIAVETTO, L. *et al.* . Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. **The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry**, v. 11, n. 6, p. 763-73, 2010.

BRANCHI, I. *et al.* . Antidepressant treatment outcome depends on the quality of the living environment: a pre-clinical investigation in mice. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62226, 2013.

BRITES, D.; FERNANDES, A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 476-496, 2015.

BRUCKLACHER-WALDERT, V. *et al.* . Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. **Brain : a journal of neurology**, v. 132, n. Pt 12, p. 3329-41, 2009.

BRUM, D. G. *et al.* . European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58925, 2013.

BRUNING, C. A. *et al.* . m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide, a multi-target selenium compound, prevented mechanical allodynia and depressive-like behavior in a mouse comorbid pain and depression model. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 63, p. 35-46, 2015.

BRUSTOLIM, D. *et al.* . A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: the antidepressant bupropion lowers production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in mice. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 6, p. 903-7, 2006.

CAHLIN, B. J.; HEDNER, J.; DAHLSTROM, L. A randomised, open-label, crossover study of the dopamine agonist, pramipexole, in patients with sleep bruxism. **Journal of sleep research**, 2016.

CALLIER, S. *et al.* . Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. **Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 95, n. 7, p. 489-502, 2003.

CAMPBELL, G. R. *et al.* . Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. **Annals of neurology**, v. 69, n. 3, p. 481-92, 2011.

CAO, L. F. *et al.* . Restoring Spinal Noradrenergic Inhibitory Tone Attenuates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Neural plasticity**, v. 2016, p. 6383240, 2016.

CAPURON, L.; DANTZER, R. Cytokines and depression: the need for a new paradigm. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17 Suppl 1, p. S119-S124, 2003.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200, 1957.

CASTREN, E.; RANTAMAKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. **Developmental neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 289-97, 2010.

CATTANEO, A. *et al.* . Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 3, p. 377-85, 2013.

CAVALLARI, M. *et al.* . Microstructural changes in the striatum and their impact on motor and neuropsychological performance in patients with multiple sclerosis. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e101199, 2014.

CERNY, O. *et al.* . Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. **Journal of immunology**, v. 194, n. 10, p. 4901-13, 2015.

CHASTAIN, E. M. *et al.* . The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1812, n. 2, p. 265-74, 2011.

CHENG, F.; VIVACQUA, G.; YU, S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 42, n. 4, p. 242-8, 2011.

CHING-LOPEZ, A. *et al.* . Epidemiological support for genetic variability at hypothalamic-pituitary-adrenal axis and serotonergic system as risk factors for major depression. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 11, p. 2743-54, 2015.

CITO, M. C. *et al.* . Antidepressant-like effect of Hoodia gordonii in a forced swimming test in mice: evidence for involvement of the monoaminergic system. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, v. 48, n. 1, p. 57-64, 2015.

CLAYTON, D. F.; GEORGE, J. M. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. **Journal of neuroscience research**, v. 58, n. 1, p. 120-9, 1999.

COMABELLA, M.; KHOURY, S. J. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical immunology**, v. 142, n. 1, p. 2-8, 2012.

COMIM, C. M. *et al.* . Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. **Neurotoxicity research**, v. 17, n. 3, p. 279-86, 2010.

CONRAD, C. D. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. **Reviews in the neurosciences**, v. 19, n. 6, p. 395-411, 2008.

COSENTINO, M. *et al.* . Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 632-42, 2007.

COSENTINO, M. *et al.* . Dopaminergic modulation of CD4+CD25(high) regulatory T lymphocytes in multiple sclerosis patients during interferon-beta therapy. **Neuroimmunomodulation**, v. 19, n. 5, p. 283-92, 2012.

CUNHA, M. P. *et al.* . Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. **Journal of psychopharmacology**, v. 26, n. 11, p. 1489-1501, 2012.

D'AUDIFFRET, A. C. *et al.* . Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease? **Journal of applied physiology**, v. 108, n. 5, p. 1041-51, 2010.

DAGINAKATTE, G. C. *et al.* . Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines. **Experimental neurology**, v. 210, n. 1, p. 261-7, 2008a.

_____. Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines. **Experimental neurology**, v. 210, n. 1, p. 261-267, 2008b.

DELLAGIOIA, N.; HANNESTAD, J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 34, n. 1, p. 130-143, 2010.

DEVANE, C. L. *et al.* . Anxiety disorders in the 21st century: status, challenges, opportunities, and comorbidity with depression. **The American journal of managed care**, v. 11, n. 12 Suppl, p. S344-53, 2005.

DIAO, L.; SHU, Y.; POLLI, J. E. Uptake of pramipexole by human organic cation transporters. **Molecular pharmaceuticals**, v. 7, n. 4, p. 1342-7, 2010.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 3, n. 4, p. 461-91, 2013.

DIJKSTRA, C. D. *et al.* . Therapeutic effect of the D2-dopamine agonist bromocriptine on acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 2, p. 135-42, 1994.

DO OLIVAL, G. S. *et al.* . Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 172, 2013.

DONG, C. Helper T-cell heterogeneity: a complex developmental issue in the immune system. **Cellular & molecular immunology**, v. 7, n. 3, p. 163, 2010.

DONNAN, G. A. *et al.* . Evidence for plasticity of the dopaminergic system in parkinsonism. **Molecular neurobiology**, v. 5, n. 2-4, p. 421-33, 1991.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain structure & function**, v. 213, n. 1-2, p. 93-118, 2008.

DSM 5 - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5. Porto Alegre: Artmed, 2014.

DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 3, p. 417-26, 2004.

DUFFY, S. S.; LEES, J. G.; MOALEM-TAYLOR, G. The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Multiple sclerosis international**, v. 2014, p. 285245, 2014.

DUHEN, R. *et al.* . Cutting edge: the pathogenicity of IFN-gamma-producing Th17 cells is independent of T-bet. **Journal of immunology**, v. 190, n. 9, p. 4478-82, 2013.

DUMAN, R. S.; LI, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists.

Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, v. 367, n. 1601, p. 2475-84, 2012.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-27, 2006.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 81, n. 3, p. 688-693, 2005.

DUTRA, R. C. *et al.* . The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: evidence for the involvement of astrocytes. **Neurobiology of disease**, v. 54, p. 82-93, 2013.

EBRAHIMI-FAKHARI, D. *et al.* . Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of alpha-synuclein. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 41, p. 14508-20, 2011.

ELSWORTH, J. D.; ROTH, R. H. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. **Experimental neurology**, v. 144, n. 1, p. 4-9, 1997.

ENGEL, C.; GREIM, B.; ZETTL, U. K. Diagnostics of cognitive dysfunctions in multiple sclerosis. **Journal of neurology**, v. 254 Suppl 2, p. II30-4, 2007.

ENGELHARDT, B.; KAPPOS, L. Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. **Neuro-degenerative diseases**, v. 5, n. 1, p. 16-22, 2008.

ETTLE, B. *et al.* . alpha-Synuclein deficiency promotes neuroinflammation by increasing Th1 cell-mediated immune responses. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 201, 2016.

EURELINGS, L. S. *et al.* . Low-grade inflammation differentiates between symptoms of apathy and depression in community-dwelling

older individuals. **International psychogeriatrics / IPA**, v. 27, n. 4, p. 639-47, 2015.

FAIRCHILD, K. D. *et al.* . Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 297, n. 4, p. R1019-R1027, 2009.

FARBOOD, Y. *et al.* . Ellagic Acid Protects the Brain Against 6-Hydroxydopamine Induced Neuroinflammation in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Basic and clinical neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 83-89, 2015a.

_____. Ellagic Acid Protects the Brain Against 6-Hydroxydopamine Induced Neuroinflammation in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Basic and clinical neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 83-9, 2015b.

FARZI, A. *et al.* . Synergistic effects of NOD1 or NOD2 and TLR4 activation on mouse sickness behavior in relation to immune and brain activity markers. **Brain, behavior, and immunity**, v. 44, p. 106-120, 2015.

FAWCETT, J. *et al.* . Clinical Experience With High-Dosage Pramipexole in Patients With Treatment-Resistant Depressive Episodes in Unipolar and Bipolar Depression. **The American journal of psychiatry**, v. 173, n. 2, p. 107-11, 2016.

FDA. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION. 2016. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/020667s034lbl.pdf. Acesso em: 22-11-2016.

FELGER, J. C.; TREADWAY, M. T. Inflammation Effects on Motivation and Motor Activity: Role of Dopamine. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, 2016.

FERRARI-TONINELLI, G. *et al.* . Mitochondria-targeted antioxidant effects of S(-) and R(+) pramipexole. **BMC pharmacology**, v. 10, p. 2, 2010.

FJAER, S. *et al.* . Magnetization transfer ratio does not correlate to myelin content in the brain in the MOG-EAE mouse model. **Neurochemistry international**, v. 83-84, p. 28-40, 2015.

FRENOIS, F. *et al.* . Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 516-531, 2007.

FRODL, T. *et al.* . Effect of hippocampal and amygdala volumes on clinical outcomes in major depression: a 3-year prospective magnetic resonance imaging study. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 33, n. 5, p. 423-30, 2008.

FRUHAUF, P. K. *et al.* . Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, p. 3-14, 2015.

FURUZAWA, M. *et al.* . Diurnal variation of heart rate, locomotor activity, and body temperature in interleukin-1 alpha/beta doubly deficient mice. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, n. 1, p. 49-56, 2002.

FUX, C. A. *et al.* . Cytomegalovirus-associated acute transverse myelitis in immunocompetent adults. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1187-90, 2003.

GANGULY, D. *et al.* . The role of dendritic cells in autoimmunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 8, p. 566-77, 2013.

GAO, H. M. *et al.* . Neuroinflammation and alpha-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. **Environmental health perspectives**, v. 119, n. 6, p. 807-14, 2011.

GAWALI, N. B. *et al.* . Agmatine ameliorates lipopolysaccharide induced depressive-like behaviour in mice by targeting the underlying inflammatory and oxido-nitrosative mediators. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 149, p. 1-8, 2016.

GEISLER, S. *et al.* . PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. **Nature cell biology**, v. 12, n. 2, p. 119-31, 2010.

GENTILE, A. *et al.* . Dopaminergic dysfunction is associated with IL-1beta-dependent mood alterations in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neurobiology of disease**, v. 74, p. 347-358, 2015.

GEORGE, S. *et al.* . alpha-Synuclein transgenic mice reveal compensatory increases in Parkinson's disease-associated proteins DJ-1 and parkin and have enhanced alpha-synuclein and PINK1 levels after rotenone treatment. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 42, n. 2, p. 243-54, 2010.

GEURTS, J. J. *et al.* . Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 66, n. 9, p. 819-27, 2007.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. **Journal of neurology**, v. 251, n. 3, p. 261-8, 2004.

GIORELLI, M.; LIVREA, P.; TROJANO, M. Dopamine fails to regulate activation of peripheral blood lymphocytes from multiple sclerosis patients: effects of IFN-beta. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 25, n. 7, p. 395-406, 2005.

GLASS, C. K. *et al.* . Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918-34, 2010.

GOLDBERG, D. The aetiology of depression. **Psychological medicine**, v. 36, n. 10, p. 1341-7, 2006.

GONG, S. *et al.* . Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. **PLoS one**, v. 10, n. 2, p. e0117503, 2015.

GONZALEZ, H. *et al.* . Dopamine receptor D3 expressed on CD4+ T cells favors neurodegeneration of dopaminergic neurons during

Parkinson's disease. **Journal of immunology**, v. 190, n. 10, p. 5048-56, 2013.

GOODMAN, L. S. *et al.* . **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. New York: McGraw-Hill Medical, 2011. ISBN 978-0-07-162442-8.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 6, p. 393-407, 2009.

GREENBERG, P. E. *et al.* . The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000? **The Journal of clinical psychiatry**, v. 64, n. 12, p. 1465-75, 2003.

GRENIER-BROSSETTE, N. *et al.* . Pertussis toxin-induced mitogenesis in human T lymphocytes. **Immunopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 109-19, 1991.

GRIGORIADIS, N.; VAN PESCH, V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. **European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, v. 22 Suppl 2, p. 3-13, 2015.

GUO, J. *et al.* . Etazolate abrogates the lipopolysaccharide (LPS)-induced downregulation of the cAMP/pCREB/BDNF signaling, neuroinflammatory response and depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 263, p. 1-14, 2014.

GWATHMEY, K.; BALOGUN, R. A.; BURNS, T. Neurologic indications for therapeutic plasma exchange: 2013 update. **Journal of clinical apheresis**, v. 29, n. 4, p. 211-9, 2014.

HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 6, p. 788-94, 2004.

HALARIS, A. Comorbidity between depression and cardiovascular disease. **International angiology : a journal of the International Union of Angiology**, v. 28, n. 2, p. 92-9, 2009.

HAMPE, C. *et al.* . Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. **Human molecular genetics**, v. 15, n. 13, p. 2059-75, 2006.

HANAMI, K. *et al.* . Dopamine D2-like receptor signaling suppresses human osteoclastogenesis. **Bone**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2013.

HASEGAWA-ISHII, S. *et al.* . Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the brain-immune interface. **Scientific reports**, v. 6, p. 25457, 2016a.

_____. Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the brain-immune interface. **Scientific reports**, v. 6, p. 25457, 2016b.

HASKO, G. *et al.* . Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by dopamine receptor agonists and antagonists in mice. **Immunology letters**, v. 49, n. 3, p. 143-7, 1996.

HAWTHORNE, J. M.; CALEY, C. F. Extrapyramidal Reactions Associated with Serotonergic Antidepressants. **The Annals of pharmacotherapy**, v. 49, n. 10, p. 1136-52, 2015.

HE, H. *et al.* . NK cells promote neutrophil recruitment in the brain during sepsis-induced neuroinflammation. **Scientific reports**, v. 6, p. 27711, 2016.

HE, Y. *et al.* . Astragaloside IV attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis of mice by counteracting oxidative stress at multiple levels. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e76495, 2013.

HIDAKA, Y. *et al.* . Cytokine production profiles in chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis: IFN-gamma and TNF-alpha are important participants in the first attack but not in the relapse. **Journal of the neurological sciences**, v. 340, n. 1-2, p. 117-22, 2014.

HO, A.; BLUM, M. Regulation of astroglial-derived dopaminergic neurotrophic factors by interleukin-1 beta in the striatum of young and middle-aged mice. **Experimental neurology**, v. 148, n. 1, p. 348-59, 1997.

HOLTZHEIMER, P. E., 3RD; NEMEROFF, C. B. Advances in the treatment of depression. **NeuroRx : the journal of the American**

Society for Experimental NeuroTherapeutics, v. 3, n. 1, p. 42-56, 2006.

HONG, H.; KIM, B. S.; IM, H. I. Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. **International neurourology journal**, v. 20, n. Suppl 1, p. S2-7, 2016.

HUI POON, S.; SIM, K.; BALDESSARINI, R. J. Pharmacological Approaches for Treatment-resistant Bipolar Disorder. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 5, p. 592-604, 2015.

HUNTER, R. M. *et al.* . Modelling the cost-effectiveness of preventing major depression in general practice patients. **Psychological medicine**, v. 44, n. 7, p. 1381-90, 2014.

HUSSAIN, T.; LOKHANDWALA, M. F. Renal dopamine receptors and hypertension. **Experimental biology and medicine**, v. 228, n. 2, p. 134-42, 2003.

INDEN, M. *et al.* . Neuroprotective effect of the antiparkinsonian drug pramipexole against nigrostriatal dopaminergic degeneration in rotenone-treated mice. **Neurochemistry international**, v. 55, n. 8, p. 760-767, 2009.

INOUE, T.; KOYAMA, T. Effects of acute and chronic administration of high-dose corticosterone and dexamethasone on regional brain dopamine and serotonin metabolism in rats. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 147-56, 1996.

IRAVANI, M. M. *et al.* . Continuous subcutaneous infusion of pramipexole protects against lipopolysaccharide-induced dopaminergic cell death without affecting the inflammatory response. **Experimental neurology**, v. 212, n. 2, p. 522-31, 2008.

ISHIKAWA, E.; MORI, D.; YAMASAKI, S. Recognition of Mycobacterial Lipids by Immune Receptors. **Trends in immunology**, 2016.

JAFARI, M. *et al.* . Distorted expression of dopamine receptor genes in systemic lupus erythematosus. **Immunobiology**, v. 218, n. 7, p. 979-83, 2013.

JINDAL, A.; MAHESH, R.; BHATT, S. Type 4 phosphodiesterase enzyme inhibitor, rolipram rescues behavioral deficits in olfactory bulbectomy models of depression: Involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, cAMP signaling aspects and antioxidant defense system. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 132, p. 20-32, 2015.

JOYCE, J. N. *et al.* . Low dose pramipexole is neuroprotective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease, and downregulates the dopamine transporter via the D3 receptor. **BMC biology**, v. 2, p. 22-34, 2004.

JUNG, Y.; ST LOUIS, E. K. Treatment of REM Sleep Behavior Disorder. **Current treatment options in neurology**, v. 18, n. 11, p. 50, 2016.

KANG, R. *et al.* . A novel PINK1- and PARK2-dependent protective neuroimmune pathway in lethal sepsis. **Autophagy**, p. 1-12, 2016.

KATAOKA, H.; UENO, S. Auditory musical hallucinations associated with extended-release pramipexole in an elderly patient with Parkinson's disease. **Medicine**, v. 93, n. 27, p. e251, 2014.

KAUSHIK, D. K. *et al.* . Interleukin-1beta orchestrates underlying inflammatory responses in microglia via Kruppel-like factor 4. **Journal of neurochemistry**, v. 127, n. 2, p. 233-244, 2013.

KAWAKAMI, N. *et al.* . Autoimmune CD4+ T cell memory: lifelong persistence of encephalitogenic T cell clones in healthy immune repertoires. **Journal of immunology**, v. 175, n. 1, p. 69-81, 2005.

KESSLER, R. C. Epidemiology of women and depression. **Journal of affective disorders**, v. 74, n. 1, p. 5-13, 2003.

KONSMAN, J. P. *et al.* . Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. **The European journal of neuroscience**, v. 28, n. 12, p. 2499-510, 2008.

KOO, J. W.; DUMAN, R. S. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 2, p. 751-756, 2008.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

KRONSTEIN, P. D. *et al.* . Summary of findings from the FDA regulatory science forum on measuring sexual dysfunction in depression trials. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 76, n. 8, p. 1050-9, 2015.

KRUMBHOLZ, M. *et al.* . B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. **Nature reviews. Neurology**, v. 8, n. 11, p. 613-23, 2012.

KUDRYAVTSEVA, N. N.; BAKSHTANOVSKAYA, I. V.; KORYAKINA, L. A. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 38, n. 2, p. 315-20, 1991.

KVERNMO, T.; HARTTER, S.; BURGER, E. A review of the receptor-binding and pharmacokinetic properties of dopamine agonists. **Clinical therapeutics**, v. 28, n. 8, p. 1065-1078, 2006.

LAUTERBACH, E. C. *et al.* . Psychopharmacological neuroprotection in neurodegenerative disease: assessing the preclinical data. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 8-18, 2010.

LAYE, S. *et al.* . Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 5 Pt 2, p. R1327-31, 1995.

LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 33-8, 2006.

LEISTEDT, S. J.; LINKOWSKI, P. Brain, networks, depression, and more. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 55-62, 2013.

LEPINE, B. A. *et al.* . Treatment-resistant depression increases health costs and resource utilization. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 34, n. 4, p. 379-88, 2012.

LEVITE, M. DOPAMINE AND T CELLS: Receptors, Direct and Potent Effects, Endogenous Production and Abnormalities in Autoimmune, Neurological and Psychiatric Diseases. **Acta physiologica**, 2015.

LI, C. *et al.* . Neuroprotection of pramipexole in UPS impairment induced animal model of Parkinson's disease. **Neurochemical research**, v. 35, n. 10, p. 1546-56, 2010.

LI, R. *et al.* . Low molecular weight heparin prevents lipopolysaccharide induced-hippocampus-dependent cognitive impairments in mice. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 8, p. 8881-8891, 2015.

LI, X. Y. *et al.* . Myelitis in systemic lupus erythematosus frequently manifests as longitudinal and sometimes occurs at low disease activity. **Lupus**, v. 23, n. 11, p. 1178-86, 2014.

LINDQVIST, D. *et al.* . Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47387, 2012.

LINEHAN, V. *et al.* . Concentration-dependent activation of dopamine receptors differentially modulates GABA release onto orexin neurons. **The European journal of neuroscience**, v. 42, n. 3, p. 1976-83, 2015.

LIU, S. F.; MALIK, A. B. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 290, n. 4, p. L622-L645, 2006.

LOUVEAU, A. *et al.* . Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 337-41, 2015.

LU, J. Q. *et al.* . Association of alpha-synuclein immunoreactivity with inflammatory activity in multiple sclerosis lesions. **Journal of**

neuropathology and experimental neurology, v. 68, n. 2, p. 179-89, 2009.

LUBLIN, F. D. New multiple sclerosis phenotypic classification. **European neurology**, v. 72 Suppl 1, p. 1-5, 2014.

LUBLIN, F. D.; REINGOLD, S. C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. **Neurology**, v. 46, n. 4, p. 907-11, 1996.

LUCAS, R. M. *et al.* . Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. **Neurodegenerative disease management**, v. 5, n. 5, p. 413-24, 2015.

MA, J. *et al.* . Activation of D1-like receptor-dependent phosphatidylinositol signal pathway by SKF83959 inhibits voltage-gated sodium channels in cultured striatal neurons. **Brain research**, v. 1615, p. 71-9, 2015.

MACQUEEN, G. M. *et al.* . Posterior hippocampal volumes are associated with remission rates in patients with major depressive disorder. **Biological psychiatry**, v. 64, n. 10, p. 880-3, 2008.

MADEEH HASHMI, A. *et al.* . The fiery landscape of depression: A review of the inflammatory hypothesis. **Pakistan journal of medical sciences**, v. 29, n. 3, p. 877-884, 2013.

MAES, M. *et al.* . Evidence for a systemic immune activation during depression: results of leukocyte enumeration by flow cytometry in conjunction with monoclonal antibody staining. **Psychological medicine**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 1992.

MAES, M.; SONG, C.; YIRMIYA, R. Targeting IL-1 in depression. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 16, n. 11, p. 1097-1112, 2012.

MAES, M. *et al.* . The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metabolic brain disease**, v. 24, n. 1, p. 27-53, 2009.

MAHAD, D.; LASSMANN, H.; TURNBULL, D. Review: Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 34, n. 6, p. 577-89, 2008.

MAJIDI-ZOLBANIN, J. *et al.* . Prenatal maternal immune activation increases anxiety- and depressive-like behaviors in offspring with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neuroscience**, v. 294, p. 69-81, 2015.

MAMAD, O. *et al.* . Dopaminergic control of the globus pallidus through activation of D2 receptors and its impact on the electrical activity of subthalamic nucleus and substantia nigra reticulata neurons. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0119152, 2015.

MAMELI, G. *et al.* . Epstein-Barr virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis peptides are cross recognized by anti-myelin basic protein antibodies in multiple sclerosis patients. **Journal of neuroimmunology**, v. 270, n. 1-2, p. 51-5, 2014.

MANNING, K. J. Hippocampal Neuroinflammation and Depression: Relevance to Multiple Sclerosis and Other Neuropsychiatric Illnesses. **Biological psychiatry**, v. 80, n. 1, p. e1-2, 2016.

MAO, Q. Q. *et al.* . Long-term treatment with peony glycosides reverses chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior via increasing expression of neurotrophins in rat brain. **Behavioural brain research**, v. 210, n. 2, p. 171-7, 2010a.

MAO, Q. Q. *et al.* . Herbal formula SYJN increases neurotrophin-3 and nerve growth factor expression in brain regions of rats exposed to chronic unpredictable stress. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 182-6, 2010b.

MARCHI, L. F. *et al.* . In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. **International immunopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 228-35, 2014.

MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D. *et al.* . Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 2010-2022, 2013.

MASOPUST, D.; SCHENKEL, J. M. The integration of T cell migration, differentiation and function. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 5, p. 309-20, 2013.

MASSART, R.; MONGEAU, R.; LANFUMEY, L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2485-94, 2012.

MASTRONARDI, C. A.; YU, W. H.; MCCANN, S. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release is controlled by the central nervous system. **Neuroimmunomodulation**, v. 9, n. 3, p. 148-56, 2001.

MATT, S. M.; JOHNSON, R. W. Neuro-immune dysfunction during brain aging: new insights in microglial cell regulation. **Current opinion in pharmacology**, v. 26, p. 96-101, 2016.

MAWANDA, F.; WALLACE, R. Can infections cause Alzheimer's disease? **Epidemiologic reviews**, v. 35, p. 161-80, 2013.

MCCUTCHEON, S. T. *et al.* . Clinicopathological correlates of depression in early Alzheimer's disease in the NACC. **International journal of geriatric psychiatry**, p. in press, 2016.

MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nature immunology**, v. 8, n. 9, p. 913-9, 2007.

MCKERNAN, D. P.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. "Killing the Blues": a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? **Progress in neurobiology**, v. 88, n. 4, p. 246-63, 2009.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MEHNERT, A. *et al.* . Four-week prevalence of mental disorders in patients with cancer across major tumor entities. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 32, n. 31, p. 3540-6, 2014.

MIGUEL-HIDALGO, J. J.; RAJKOWSKA, G. Morphological brain changes in depression: can antidepressants reverse them? **CNS drugs**, v. 16, n. 6, p. 361-72, 2002.

MILLER, A. H. *et al.* . Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. **Depression and anxiety**, v. 30, n. 4, p. 297-306, 2013.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature reviews. Immunology**, v. 16, n. 1, p. 22-34, 2016.

MING, Z. *et al.* . Systemic lipopolysaccharide-mediated alteration of cortical neuromodulation involves increases in monoamine oxidase-A and acetylcholinesterase activity. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, p. 37, 2015.

MISSALE, C. *et al.* . Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological reviews**, v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998.

MOGHADASI, A. N. *et al.* . Behavioral Neurology of Multiple Sclerosis and Autoimmune Encephalopathies. **Neurologic clinics**, v. 34, n. 1, p. 17-31, 2016.

MOORE, N.; POLLACK, C.; BUTKERAIT, P. Adverse drug reactions and drug-drug interactions with over-the-counter NSAIDs. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 11, p. 1061-75, 2015.

MOORE, T. J.; GLENMULLEN, J.; MATTISON, D. R. Reports of pathological gambling, hypersexuality, and compulsive shopping associated with dopamine receptor agonist drugs. **JAMA internal medicine**, v. 174, n. 12, p. 1930-3, 2014.

MORETTI, M. *et al.* . Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)). **Neurotoxicity research**, v. 28, n. 3, p. 222-231, 2015.

MUSCAT, R.; PAPP, M.; WILLNER, P. Antidepressant-like effects of dopamine agonists in an animal model of depression. **Biological psychiatry**, v. 31, n. 9, p. 937-46, 1992.

NAGAI, Y. *et al.* . Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease. **Neurology**, v. 46, n. 3, p. 791-5, 1996.

NAKANO, K. *et al.* . Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 373, n. 2, p. 286-91, 2008.

NAKANO, K. *et al.* . Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naive T cells and D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. **Journal of immunology**, v. 186, n. 6, p. 3745-52, 2011.

NCBI. National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database; CID=119570,, 2016. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119570>>. Acesso em: 23-11-2016.

NEWMAN-TANCREDI, A. *et al.* . Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. II. Agonist and antagonist properties at subtypes of dopamine D(2)-like receptor and alpha(1)/alpha(2)-adrenoceptor. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 805-14, 2002.

NEZAFATI, M. H.; VOJDANPARAST, M.; NEZAFATI, P. Antidepressants and cardiovascular adverse events: A narrative review. **ARYA atherosclerosis**, v. 11, n. 5, p. 295-304, 2015.

NISIJIMA, K.; SHIODA, K.; IWAMURA, T. Neuroleptic malignant syndrome and serotonin syndrome. **Progress in brain research**, v. 162, p. 81-104, 2007.

NOLAN, Y. *et al.* . Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. **Experimental neurology**, v. 184, n. 2, p. 794-804, 2003.

NOWACKA, M. M. *et al.* . LPS reduces BDNF and VEGF expression in the structures of the HPA axis of chronic social stressed female rats. **Neuropeptides**, v. 54, p. 17-27, 2015.

NUNES, E. J. *et al.* . Effort-related motivational effects of the pro-inflammatory cytokine interleukin 1-beta: studies with the concurrent fixed ratio 5/ chow feeding choice task. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 4, p. 727-36, 2014.

O'CALLAGHAN, J. P. *et al.* . Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e102003, 2014.

OSTADHADI, S. *et al.* . Antidepressant effect of pramipexole in mice forced swimming test: A cross talk between dopamine receptor and NMDA/nitric oxide/cGMP pathway. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 81, p. 295-304, 2016.

OUADGHIRI, S. *et al.* . Genetic factors and multiple sclerosis in the Moroccan population: A role for HLA class II. **Pathologie-biologie**, 2013.

PACHECO, R.; CONTRERAS, F.; ZOUALI, M. The dopaminergic system in autoimmune diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 117, 2014.

PAPADOPOULOS, D. *et al.* . Upregulation of alpha-synuclein in neurons and glia in inflammatory demyelinating disease. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 31, n. 4, p. 597-612, 2006.

PAPAKOSTAS, G. I. Identifying patients with depression who require a change in treatment and implementing that change. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 77 Suppl 1, p. 16-21, 2016.

PARK, S. E. *et al.* . Insulin-like growth factor-I peptides act centrally to decrease depression-like behavior of mice treated intraperitoneally with lipopolysaccharide. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, p. 179, 2011.

PATRUCCO, L. *et al.* . HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Argentina. **European journal of neurology : the official journal of**

the European Federation of Neurological Societies, v. 16, n. 3, p. 427-9, 2009.

PEIXOTO, H. G. E. *et al.* . Antidepressivos e alterações no peso corporal. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 341-348, 2008.

PENNOCK, N. D. *et al.* . T cell responses: naive to memory and everything in between. **Advances in physiology education**, v. 37, n. 4, p. 273-83, 2013.

PETRUCELLI, L. *et al.* . Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. **Neuron**, v. 36, n. 6, p. 1007-19, 2002.

PODDA, M. V. *et al.* . Dopamine D1-like receptor activation depolarizes medium spiny neurons of the mouse nucleus accumbens by inhibiting inwardly rectifying K⁺ currents through a cAMP-dependent protein kinase A-independent mechanism. **Neuroscience**, v. 167, n. 3, p. 678-90, 2010.

POLLAK, Y.; YIRMIYA, R. Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for 'depression due to a general medical condition', immunotherapy and antidepressive treatment. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum**, v. 5, n. 4, p. 389-399, 2002.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

PRADO, C. *et al.* . Stimulation of dopamine receptor D5 expressed on dendritic cells potentiates Th17-mediated immunity. **Journal of immunology**, v. 188, n. 7, p. 3062-70, 2012.

Pramipexole marketed for Parkinson's disease. **American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists**, v. 54, n. 17, p. 1922, 1997.

PRESGRAVES, S. P. *et al.* . Involvement of dopamine D(2)/D(3) receptors and BDNF in the neuroprotective effects of S32504 and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium in terminally differentiated SH-SY5Y cells. **Experimental neurology**, v. 190, n. 1, p. 157-70, 2004.

PROPEL, M. J.; JOHNSON, R. W. Role of corticosterone in the behavioral effects of central interleukin-1 beta. **Physiology & behavior**, v. 61, n. 1, p. 7-13, 1997.

PUTRI, R. S. *et al.* . A Comparative Pharmacokinetics Study of the Anti-Parkinsonian Drug Pramipexole. **Scientia pharmaceutica**, v. 84, n. 4, p. 715-723, 2016.

QADRI, F. *et al.* . Acute hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to LPS-induced endotoxemia: expression pattern of kinin type B1 and B2 receptors. **Biological chemistry**, v. 397, n. 2, p. 97-109, 2016.

RAJAN, T. V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. **Trends in immunology**, v. 24, n. 7, p. 376-9, 2003.

RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORAN, B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. **Aging and disease**, v. 6, n. 5, p. 349-68, 2015.

RÉUS, G. Z. *et al.* . Neurochemical correlation between major depressive disorder and neurodegenerative diseases., v. 158, p. 121-129, 2016.

RICCI, A. *et al.* . Dopamine receptor subtypes in the human pulmonary arterial tree. **Autonomic & autacoid pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 361-9, 2006.

RIEDERER, P.; WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. **Journal of neural transmission**, v. 38, n. 3-4, p. 277-301, 1976.

RILEY, B. E. *et al.* . Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. **Nature communications**, v. 4, p. 1982, 2013.

ROMANO, M. *et al.* . There is much to be learnt about the costs of multiple sclerosis in Latin America. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 8, p. 549-55, 2013.

ROSA, P. B. *et al.* . Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 127, p. 1-6, 2014.

ROSENLING, T. *et al.* . Profiling and identification of cerebrospinal fluid proteins in a rat EAE model of multiple sclerosis. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 4, p. 2048-60, 2012.

ROSKELL, N. S. *et al.* . A meta-analysis of pain response in the treatment of fibromyalgia. **Pain practice : the official journal of World Institute of Pain**, v. 11, n. 6, p. 516-27, 2011.

ROSS, A. G. *et al.* . Neuroschistosomiasis. **Journal of neurology**, v. 259, n. 1, p. 22-32, 2012.

ROSSI, S. *et al.* . Interleukin-1beta causes excitotoxic neurodegeneration and multiple sclerosis disease progression by activating the apoptotic protein p53. **Molecular neurodegeneration**, v. 9, p. 56, 2014.

SANKOWSKI, R.; MADER, S.; VALDES-FERRER, S. I. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 28, 2015.

SCARR, E. *et al.* . Cholinergic connectivity: it's implications for psychiatric disorders. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 55, 2013.

SCHECHTER, L. E. *et al.* . Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. **NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, n. 4, p. 590-611, 2005.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American journal of psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, 1965.

SCHLICHTER, L. C. *et al.* . The Ca²⁺ activated SK3 channel is expressed in microglia in the rat striatum and contributes to microglia-mediated neurotoxicity in vitro. **Journal of neuroinflammation**, v. 7, p. 4, 2010.

SCHMIDT, E. M. *et al.* . Effects of an interleukin-1 receptor antagonist on human sleep, sleep-associated memory consolidation, and blood monocytes. **Brain, behavior, and immunity**, v. 47, p. 178-85, 2015.

SCHNEIDER, C. S.; MIERAU, J. Dopamine autoreceptor agonists: resolution and pharmacological activity of 2,6-diaminotetrahydrobenzothiazole and an aminothiazole analogue of apomorphine. **Journal of medicinal chemistry**, v. 30, n. 3, p. 494-8, 1987.

SCHREMPF, W.; ZIEMSEN, T. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. **Autoimmunity reviews**, v. 6, n. 7, p. 469-75, 2007.

SCHULTE-HERBRUGGEN, O. *et al.* . Pramipexole is active in depression tests and modulates monoaminergic transmission, but not brain levels of BDNF in mice. **European journal of pharmacology**, v. 677, n. 1-3, p. 77-86, 2012.

SEN, S.; DUMAN, R.; SANACORA, G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. **Biological psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 527-32, 2008.

SERAFINE, K. M.; BRISCIONE, M. A.; RILEY, A. L. The effects of haloperidol on cocaine-induced conditioned taste aversions. **Physiology & behavior**, v. 105, n. 5, p. 1161-1167, 2012.

SHIBAGAKI, K. *et al.* . Beneficial protective effect of pramipexole on light-induced retinal damage in mice. **Experimental eye research**, v. 139, p. 64-72, 2015.

SKELLY, D. T. *et al.* . A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1beta, [corrected] TNF-alpha and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e69123, 2013.

SLAVICH, G. M.; IRWIN, M. R. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. **Psychological bulletin**, v. 140, n. 3, p. 774-815, 2014a.

_____. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. **Psychological bulletin**, v. 140, n. 3, p. 774-815, 2014b.

SMITH, R. S. The immune system is a key factor in the etiology of psychosocial disease. **Medical hypotheses**, v. 34, n. 1, p. 49-57, 1991.

SONG, C.; MANKU, M. S.; HORROBIN, D. F. Long-chain polyunsaturated fatty acids modulate interleukin-1beta-induced changes in behavior, monoaminergic neurotransmitters, and brain inflammation in rats. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 5, p. 954-63, 2008.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 683-747, 2005.

STEPANICHEV, M. *et al.* . Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. **BioMed research international**, v. 2014, p. 932757, 2014.

STERU, L. *et al.* . The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

STROMNES, I. M. *et al.* . Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. **Nature medicine**, v. 14, n. 3, p. 337-42, 2008.

STROMNES, I. M.; GOVERMAN, J. M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature protocols**, v. 1, n. 4, p. 1810-9, 2006.

SULAKHIYA, K. *et al.* . Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. **Neuroscience letters**, v. 611, p. 106-11, 2016.

SUNDSTROM, P.; SALZER, J. Vitamin D and multiple sclerosis-from epidemiology to prevention. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 132, n. 199, p. 56-61, 2015.

SUZUKI, K. *et al.* . Does pramipexole treatment improve headache in patients with concomitant migraine and restless legs syndrome? **Tremor and other hyperkinetic movements**, v. 3, 2013.

TAO, K.; WANG, X. The comorbidity of epilepsy and depression: diagnosis and treatment. **Expert review of neurotherapeutics**, p. 1-13, 2016.

TAYLOR, B. K.; JOSHI, C.; UPPAL, H. Stimulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. **Brain research**, v. 987, n. 2, p. 135-43, 2003.

TRIPATHI, S. K.; LAHESMAA, R. Transcriptional and epigenetic regulation of T-helper lineage specification. **Immunological reviews**, v. 261, n. 1, p. 62-83, 2014.

TULLMAN, M. J. A review of current and emerging therapeutic strategies in multiple sclerosis. **The American journal of managed care**, v. 19, n. 2 Suppl, p. s21-7, 2013.

TURNER, A. P. *et al.* . Mental Health Comorbidity in MS: Depression, Anxiety, and Bipolar Disorder. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 16, n. 12, p. 106, 2016.

UEDA, K. *et al.* . Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11282-6, 1993.

VAMVAKIDES, A. [Effect of presynaptic dopaminergic agonism on the immobility of mice in the forced swimming test]. **Annales pharmaceutiques francaises**, v. 57, n. 5, p. 374-379, 1999.

VAN HEESCH, F. *et al.* . Lipopolysaccharide increases degradation of central monoamines: an in vivo microdialysis study in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex of mice. **European journal of pharmacology**, v. 725, p. 55-63, 2014.

VANDERSCHUREN, L. J. *et al.* . Opposing role of dopamine D1 and D2 receptors in modulation of rat nucleus accumbens noradrenaline release. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 4123-31, 1999.

VIELKIND, U. *et al.* . Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. **Journal of neuroscience research**, v. 27, n. 3, p. 360-73, 1990.

VREEBURG, S. A. *et al.* . Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. **Archives of general psychiatry**, v. 66, n. 6, p. 617-26, 2009.

WADE, B. J. Spatial analysis of global prevalence of multiple sclerosis suggests need for an updated prevalence scale. **Multiple sclerosis international**, v. 2014, p. 124578, 2014.

WALCZAK, J. S.; BEAULIEU, P. Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: the double plate technique. **Neuroscience letters**, v. 399, n. 3, p. 240-4, 2006.

WANG, H. *et al.* . Cerebrospinal fluid alpha-synuclein levels are elevated in multiple sclerosis and neuromyelitis optica patients during relapse. **Journal of neurochemistry**, v. 122, n. 1, p. 19-23, 2012.

WEN, M. M. Advances and challenges in the dosage form design for the treatment of Parkinson's disease. **Discovery medicine**, v. 14, n. 79, p. 369-77, 2012.

WEST, T. W. Transverse myelitis--a review of the presentation, diagnosis, and initial management. **Discovery medicine**, v. 16, n. 88, p. 167-77, 2013.

WILHELMUS, M. M. *et al.* . Involvement and interplay of Parkin, PINK1, and DJ1 in neurodegenerative and neuroinflammatory disorders. **Free radical biology & medicine**, v. 53, n. 4, p. 983-92, 2012.

WILLIAMS, A.; PIATON, G.; LUBETZKI, C. Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis? **Glia**, v. 55, n. 13, p. 1300-12, 2007.

WILLNER, P. *et al.* . Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358-64, 1987.

WITTE, M. E. *et al.* . Parkinson's disease-associated parkin colocalizes with Alzheimer's disease and multiple sclerosis brain lesions. **Neurobiology of disease**, v. 36, n. 3, p. 445-52, 2009.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 343-51, 2001.

XIE, Y. *et al.* . Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors. **Journal of biomedical science**, v. 19, p. 14, 2012.

XING, L. *et al.* . Dopamine D1 receptor activation regulates the expression of the estrogen synthesis gene aromatase B in radial glial cells. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 310, 2015.

YACILA, G.; SARI, Y. Potential therapeutic drugs and methods for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 31, p. 3583-93, 2014.

YANO, S.; AKAHANE, M.; HARADA, M. Contribution of sympatho-adrenal system to the gastric movement of rats subjected to restraint and water immersion stress. **Japanese journal of pharmacology**, v. 27, n. 5, p. 635-43, 1977.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain research**, v. 711, n. 1-2, p. 163-74, 1996.

YIRMIYA, R. *et al.* . Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 531-44, 2001.

YIRMIYA, R.; RIMMERMAN, N.; RESHEF, R. Depression as a microglial disease. **Trends in neurosciences**, v. 38, n. 10, p. 637-658, 2015.

ZHAO, W. *et al.* . Dopamine receptors modulate cytotoxicity of natural killer cells via cAMP-PKA-CREB signaling pathway. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e65860, 2013.

ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. *et al.* . Persistent inflammation in the CNS during chronic EAE despite local absence of IL-17 production. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 519627, 2013.

ANEXO 1 – Revisão em revista não indexada

Studies on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Latin America: a critical review and future therapeutic implications

Estudos sobre encefalomielite autoimune experimental (EAE) na América Latina: uma revisão crítica e implicações terapêuticas futuras

Estudios sobre la encefalomiéлитis autoimune experimental (EAE) en América Latina: una revisión crítica y futuras implicaciones terapéuticas

Abstract

Vicente Lieberknecht^{1,2}
Rafael Cypriano Dutra^{1,2}

¹Laboratory of Autoimmunity and Immunopharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Araranguá, 88900-000, Araranguá, SC, Brazil

²Neuroscience Postgraduate Program, Centre of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, 89040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic T lymphocytes-mediated autoimmune demyelinating inflammatory disease of the central nervous system (CNS), in which Th1 and Th17 lymphocytes play a critical role. The degree of white matter inflammation, loss of myelin sheath and consequent neuronal degeneration are thought to determine the disease severity. Clinical symptoms in MS include a progressive decline in motor, cognitive, sensory functions and consequently permanent disability. Although several CNS demyelinating models had been created to study the development of the disease and possible therapies, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is essentially the most reliable model used, which can be induced in susceptible rodents and other animals by immunization



Pramipexole, a Dopamine D2/D3 Receptor-Preferring Agonist, Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Development in Mice

Vicente Lieberknecht^{1,2,3} · Stella C. Junqueira^{1,2} · Mauricio P. Cunha³ ·
Thais A. Barbosa¹ · Luiz F. de Souza³ · Igor S. Coelho^{2,4} · Adair R. S. Santos^{2,4} ·
Ana Lúcia S. Rodrigues^{2,3} · Alcir L. Dafre^{2,3} · Rafael C. Dutra^{1,2}

Received: 17 November 2015 / Accepted: 12 January 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most used animal model of multiple sclerosis (MS) for the development of new therapies. Dopamine receptors can modulate EAE and MS development, thus highlighting the potential use of dopaminergic agonists in the treatment of MS, which has been poorly explored. Herein, we hypothesized that pramipexole (PPX), a dopamine D2/D3 receptor-preferring agonist commonly used to treat Parkinson's disease (PD), would be a suitable therapeutic drug for EAE. Thus, we report the effects and the underlying mechanisms of action of PPX in the prevention of EAE. PPX (0.1 and 1 mg/kg) was administered intraperitoneally (i.p.) from day 0 to 40 post-immunization (p.i.). Our results showed that PPX 1 mg/kg prevented EAE development, abolishing EAE signs by blocking neuroinflammatory response, demyelination, and astroglial activation in spinal cord. Moreover, PPX inhibited the production of inflammatory cytokines, such as IL-17, IL-1 β , and TNF- α in peripheral lymphoid tissue.

PPX was also able to restore basal levels of a number of EAE-induced effects in spinal cord and striatum, such as reactive oxygen species, glutathione peroxidase, parkin, and α -synuclein (α -syn). Thus, our findings highlight the usefulness of PPX in preventing EAE-induced motor symptoms, possibly by modulating immune cell responses, such as those found in MS and other T helper cell-mediated inflammatory diseases.

Keywords Autoimmunity · Experimental autoimmune encephalomyelitis · Dopamine receptor agonist · Pramipexole

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease associated with demyelination of the central nervous system (CNS), being mediated by T cells, especially encephalitogenic Th17 and Th1 cells [1]. MS affects about 2.5 million people worldwide, demyelinating the CNS, and inducing several clinical symptoms, such as mood disorders and cognitive, sensory, and motor impairments [2]. The average age of symptoms onset is approximately 20–40 years, with a prevalence of 2:1 for women/men [3]. The symptoms progress until total disability, leading most patients to lose their jobs within 15 years after diagnosis [3]. Besides demyelination, this disease is accompanied by other CNS alterations, including neuronal, astroglial, and oligodendroglial cell death [4,5]. Interestingly enough, similar CNS changes can be observed in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the main model used to investigate potential therapeutic molecules for MS [1].

It is well established that immune cells express the limiting enzyme for dopamine synthesis, tyrosine hydroxylase, as well

✉ Rafael C. Dutra
rafaelcdutra@gmail.com; rafael.dutra@ufsc.br

¹ Laboratory of Autoimmunity and Immunopharmacology, Campus Araranguá, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Jorge Lacerda, Km 35,4, Jardim das Avenidas, 88906-072, Araranguá, SC, Brazil

² Post-Graduate Program of Neuroscience, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

³ Department of Biochemistry, Centre of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

⁴ Neurobiology Laboratory of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

ANEXO 3 - Artigo aceito para publicação

Accepted Manuscript

Title: Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of depression

Author: Vicente Lieberknecht Mauricio Peña Cunha Stella
Célio Junqueira Igor dos Santos Coelho Luiz Felipe de Souza
Adair Roberto Soares dos Santos Ana Lúcia S. Rodrigues
Rafael Cypriano Dutra Alcir Luiz Dafre

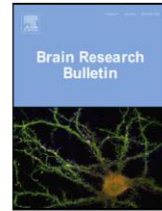
PII: S0166-4328(16)31010-5
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bbr.2016.11.007>
Reference: BBR 10547

To appear in: *Behavioural Brain Research*

Received date: 2-8-2016
Revised date: 31-10-2016
Accepted date: 4-11-2016

Please cite this article as: Lieberknecht Vicente, Cunha Mauricio Peña, Junqueira Stella Célio, Coelho Igor dos Santos, de Souza Luiz Felipe, dos Santos Adair Roberto Soares, Rodrigues Ana Lúcia S, Dutra Rafael Cypriano, Dafre Alcir Luiz. Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of depression. *Behavioural Brain Research* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.007>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



ANEXO 4 - Menção honrosa XXXVIII Reunião Anual da SBNeC



XXXVIII Reunião Anual da SBNeC

10 a 13 de Setembro de 2014, Búzios - RJ

Certificamos que

O trabalho **16.006 - PRAMIPEXOLE PREVENTS CLINICAL SYMPTOMS IN THE EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS THROUGH THE MODULATION OF GLUTATHIONE-DEPENDENT ANTIOXIDANT SYSTEM**. Autores: Vicente Lieberknecht ^{1,2}, Stella Célio Junqueira ^{1,2}, Thais Barbosa Alberti ², Maurício Peña Cunha ¹, Luiz Felipe de Souza ¹, Alcir Luiz Dafre ¹, Ana Lúcia S. Rodrigues ¹, João Batista Calixto ³, Rafael Cypriano Dutra ^{1,2,3} - ¹UFSC - Universidade Federal De Santa Catarina, ²UFSC - Universidade Federal De Santa Catarina, ³CIEnP - Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos recebeu Menção Honrosa durante a

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, realizada no Centro de Convenções do Hotel Atlântico Búzios em Armação de Búzios - Rio de Janeiro, de 10 a 13 de setembro de 2014.

Cecília Hedin Pereira
Presidente da SBNeC



ANEXO 5 - Artigos produzidos em colaboração

1. ENGEL, D.; ZOMKOWSKI, A.D.E.; LIEBERKNECHT, V.; RODRIGUES, A.L.; GABILAN, N.H. Chronic administration of duloxetine and mirtazapine downregulates proapoptotic proteins and upregulates neurotrophin gene expression. In the hippocampus and cerebral cortex of mice. *J Psychiatr Res*, v. 47, p. 802-808, 2013.
2. Rosa, P.B.; Ribeiro, C.M.; Bettio, L.E.B.; Colla, A.; Lieberknecht, V.; Moretti, M.; Rodrigues, A.L.S. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 127, p. 1-6, 2014.
3. Cunha, M.P.; Pazini, F.L.; Ludka, F.K.; Rosa, J.M.; Oliveira, A.; Budni, J.; Ramos-Hryb, A.B.; Lieberknecht, V.; Bettio, L.E.B.; Martín-de-Saavedra, M.D.; López, M.G.; Tasca, C.I.; Rodrigues, A.L.S. The modulation of NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide pathway is implicated in the anti-immobility effect of creatine in the tail suspension test. *Amino Acids*, v. 47, p. 795-811, 2015.
4. Cunha, M.P.; Lieberknecht, V. Ramos-Hryb, A.B.; Olescowicz, G.; Ludka, F.K.; Tasca, C.I.; Gabilan, N.H.; Rodrigues, A.L.S. Creatine affords protection against glutamate-induced nitrosative and oxidative stress. *Neurochem Int*, v. 95, p. 4-14, 2016.
5. Pazini, F.L.; Cunha, M.P.; Rosa, J.M.; Colla, A.R.S.; Lieberknecht, V.; Oliveira, A.; Rodrigues, A.L.S. Creatine, similar to ketamine, counteracts depressive-like behavior induced by corticosterone via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Mol Neurobiol*, In press, 2016.
6. Gonçalves, E.D.; Souza, P.S.; Lieberknecht, V.; Fidelis, G.S.P.; Barbosa, R.I.; Silveira, P.C.L.; de Pinho, R.A.; Dutra, R.C. Low-level laser therapy ameliorates disease progression in mouse model of multiple sclerosis. *Autoimmunity*, v. 49, n. 2, p. 132-142, 2016.
7. Junqueira, S.C.; Coelho, I.S.; Lieberknecht, V.; Cunha, M.P.; Calixto, J.B.; Rodrigues, A.L.S.; Santos, A.R.S.; Dutra, R.C. Inosine, an endogenous purine nucleoside, suppresses immune responses and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for A2A adenosine receptor. *Mol Neurobiol*, in press, 2016.