

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**INFLUÊNCIA DO NMDAr NO PROCESSO DE SELEÇÃO NEGATIVA DE TIMÓCITOS E SUA
REPERCUSSÃO NO MODELO MURINO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA**

BEATRIZ MAYUMI PEIXINHO

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador: Dr. Wesley Nogueira Brandão

São Paulo
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Interações Neuroimunes do departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas e todos os seus membros por terem me acolhido na sua rotina, me apresentado o mundo acadêmico e o da ciência básica e proporcionado tantos momentos de aprendizado.

Agradeço, em especial, ao Doutor Wesley Nogueira Brandão pela orientação neste Trabalho de Conclusão de Curso e por todos os ensinamentos sobre imunologia.

Agradeço aos meus pais e à minha família, por todo suporte dado nas minhas escolhas.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	3
Lista de Figuras.....	4
RESUMO.....	5
1.0 INTRODUÇÃO	6
2.0 OBJETIVOS	14
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.0 RESULTADOS	20
5.0 DISCUSSÃO	30
6.0 CONCLUSÃO	34
7.0 BIBLIOGRAFIA	35
8.0 ANEXOS	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ABN	Academia Brasileira de Neurologia
AIRE	<i>Autoimmune Regulator</i>
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> - células apresentadoras de antígeno
CCL	<i>CC Chemokine Ligand</i>
CCR	<i>CC Chemokine Receptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> - Grupamento de Diferenciação
CD	Célula Dendrítica
CFA	Adjuvante Completo de Freund
Cre	<i>Causes Recombination Enzyme</i> - Enzima Cre recombinase
cTEC	<i>Cortical Thymic Epithelial Cell</i> - células epiteliais do córtex tímica
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EM	Esclerose Múltipla
Fezf2	<i>Fez Family Zinc Finger Protein 2</i>
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IP	Iodeto de Propídio
KO	<i>Knockout</i>
MFI	<i>Median Fluorescence Intensity</i> - Intensidade de Fluorescência Média
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOG	<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i> - peptídeo da mielina de oligodendrócitos
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i> - Imagem por Ressonância Magnética
mTEC	<i>Medullary Thymic Epithelial Cell</i> - células epiteliais da medula tímica
NMDAr	Receptor NMDA - N-metil-D-aspartato
PP	Primária Progressiva
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> - Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> - espécies reativas de oxigênio
RR	Recorrente Remitente
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Secundária Progressiva
TCR	<i>T Cell Receptor</i> - receptor da célula T
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> - Fator de Transformação do Crescimento
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de Necrose Tumoral
TRA	<i>Tissue-restricted Antigens</i> - antígenos extra-tímicos
Tregs	Linfócito T Regulador

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica dos subtipos de Esclerose Múltipla	7
Figura 2. Representação do processo de tolerância central no timo.	12
Figura 3: Genotipagem para os genes Grin1 e Cre.	17
Figura 4. Animais CD4+ NMDA KO têm maior frequência de células simples positivas no timo.	20
Figuras 5. Animais CD4+ NMDA KO apresentam menor morte celular após ativação com anti-CD3.	21
Figuras 6. Animais CD4+ NMDA KO apresentam maior número de linfócitos nos órgãos linfoides secundários com 6 semanas.	22
Figuras 7. Animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas restauram números normais de linfócitos T nos órgãos linfoides secundários.	23
Figuras 8. Escore clínico dos animais controle e animais CD4+ NMDA KO, com duas idades diferentes.	24
Figura 9: Histologia da medula espinal, em diferentes aumentos.	25
Figuras 10. Animais CD4+ NMDA KO de 6 semanas apresentam maior reatividade ao MOG em células T CD4+ no SNC.	26
Figura 11. Animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas apresentam APCs menos ativadas no SNC	27
Figura 12. Animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas apresentam diferenças mais acentuadas na expressão de citocinas.	27
Figuras 13. Animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas apresentam menos células reativas ao MOG na periferia.	28
Figuras 14. Animais CD4+ NMDA KO de 6 semanas apresentam menos FoxP3.	29

RESUMO

PEIXINHO; B. M. **INFLUÊNCIA DO NMDA_r NO PROCESSO DE SELEÇÃO NEGATIVA DE TIMÓCITOS E SUA REPERCUSSÃO NO MODELO MURINO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA.** 2020. P40. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Palavras-chave: Células T, receptor NMDA, Encefalomielite Autoimune Experimental

INTRODUÇÃO: A Esclerose Múltipla é a principal autoimunidade do sistema nervoso central e sua patologia deve-se à infiltração de células imunes pela barreira hemato-encefálica, promovendo inflamação local e a morte de células residentes. Ainda não há cura para a doença, apenas medicamentos que visam a diminuição dos sinais clínicos ou que impeçam a infiltração de leucócitos no SNC. Apesar das evidências na literatura em relação às células T, as ações das células residentes do SNC e seus subprodutos na modulação destas células ainda não estão completamente esclarecidas. Dentre estes subprodutos, o glutamato, neurotransmissor excitatório mais expresso no SNC, tem demonstrado exercer um papel ativador na resposta dos linfócitos T por meio do seu receptor NMDA. Foi descrito que esta sinalização também ocorre no timo, auxiliando o processo de seleção negativa, entretanto, a repercussão dessa resposta no desenvolvimento de clones autorreativos e seu impacto no desenvolver da Esclerose Múltipla ainda não foi elucidado. **OBJETIVO:** Verificar a influência do glutamato no processo de tolerância central dos timócitos, observando as diferenças entre as etapas de maturação, sua distribuição em órgãos linfoides secundários e a repercussão na clínica da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Camundongos C57BL/6 CD4^{CRE}/Grin1^{fl/fl} e C57BL/6 Grin1^{fl/fl} com idade entre 6-10 semanas foram utilizados para extração de células do timo, baço e linfonodo para análise de frequência e número celular. Posteriormente, eles foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ para acompanhamento clínico da EAE, além de avaliação da frequência de células imunes e produção de citocinas. **RESULTADOS:** Houve mudança na proporção dos subtipos de linfócitos encontrados no timo de animais *naïve*, com aumento da população de células simples positivas; fenômeno observado também na periferia de animais CD4⁺ NMDA KO de 6 semanas, mas com uma normalização em animais com 10 semanas. Animais CD4⁺ NMDA KO de diferentes idades apresentam respostas à EAE também diferentes entre si. Durante a EAE, observa-se uma menor infiltração celular no SNC em ambos, mas a reatividade linfocitária e a capacidade de ativação de APCs é mais pronunciada com 6 semanas, em contraste com a proporção de células Treg e sua capacidade reguladora, que se apresenta mais evidente em animais mais velhos. **CONCLUSÃO:** A ausência do receptor NMDA influencia a seleção negativa de timócitos, alterando de forma mais evidente a fisiopatologia da EAE em camundongos com 10 semanas.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa em que células imunes autorreativas promovem a desmielinização dos neurônios do sistema nervoso central (SNC), levando à formação de lesões conhecidas como escleras (LASSMANN, 2018). Os indivíduos que sofrem de EM podem ter lesões em diversos eixos neuronais, o que leva a uma multiplicidade de apresentações clínicas da doença, sendo as mais comuns a neurite óptica, parestesia, espasticidade, disfunção urinária e a fadiga (FILIPPI et al., 2018). Vale mencionar, também, os distúrbios psicológicos que impactam negativamente as relações interpessoais de portadores de doenças crônicas, bem como sua pior qualidade de vida (SHAPIRO, 2009).

Segundo a cartilha “*Atlas of MS*”, feita pela *Multiple Sclerosis International Federation* (MSIF), em 2013, a prevalência de EM era, mundialmente, duas vezes mais alta em mulheres do que em homens, além de ser uma doença mais incidente em países de maior latitude, como os Estados Unidos¹. No Brasil, dados regionais reunidos pela cartilha “Recomendações Esclerose Múltipla”, feita em 2012 pela Academia Brasileira de Neurologia (ABN), estão de acordo com essa característica, sendo maior a incidência no sul e sudeste do país², e também em mulheres.

O diagnóstico da EM é de alta complexidade. De acordo com a ABN, o diagnóstico deve ser feito por um neurologista usando o critério de exclusão, com a eliminação da possibilidade de outras doenças, junto ao acúmulo de evidências clínicas, como histórico do paciente, exames clínicos, testes laboratoriais e de imagem. Tais critérios são necessários uma vez que ainda não se tem um marcador específico para a doença e sua evolução não é uniforme entre os pacientes, o que dificulta ainda mais sua identificação².

A EM pode ser classificada em três tipos principais de acordo com a sua evolução: Recorrente Remitente (RR), Primária Progressiva (PP) ou Secundária Progressiva (SP). Na RR, o indivíduo tem um período de surto seguido por um período de recuperação, com intervalos indefinidos entre os surtos; na PP, o indivíduo tem uma evolução constante da doença desde o início, tendo uma piora progressiva. Já a SP ocorre quando o indivíduo que possuía a forma RR para de se recuperar dos surtos e entra em um estado de progressão contínua do curso da doença. Vale destacar que, caso o indivíduo apresente um episódio isolado, ele é classificado como síndrome do caso clínico isolado (CIS - *clinically isolated syndrome*) (Figura 1) (FILIPPI et al., 2018).

O surto é a ocorrência ou agravamento dos sintomas neurológicos por 24 horas ou mais, podendo haver uma estabilização com recuperação completa ou parcial, de acordo com o subtipo da doença de cada indivíduo. A forma mais predominante é a RR, na qual os pacientes apresentam disfunções residuais ou melhora completa dos sintomas. Por outro lado, 90% destes pacientes evoluem para a forma SP após duas décadas do início dos sintomas, apresentando aumento contínuo da incapacidade clínica e déficit neurológico. (CONFAVREUX et al., 2000, GOLD et al., 2010).

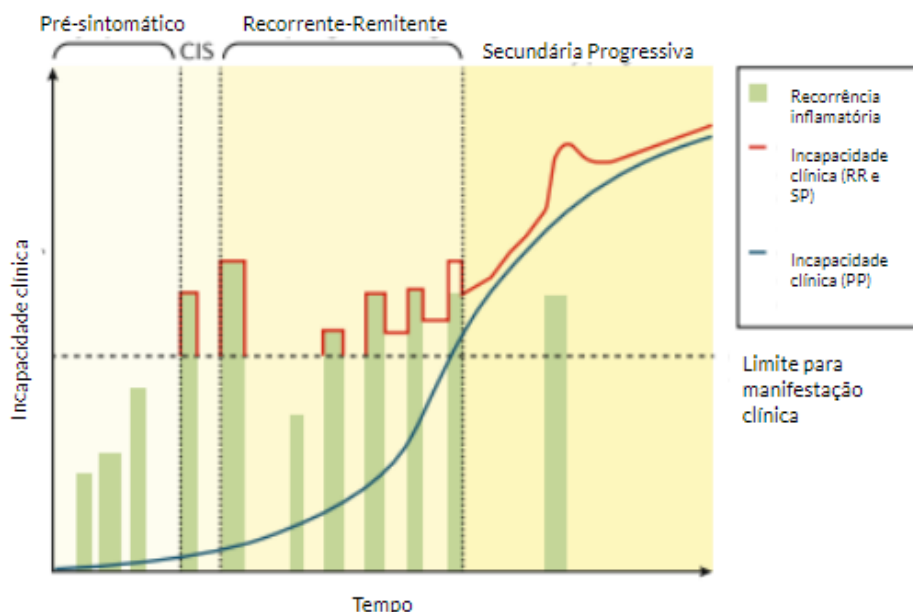


Figura 1. Representação gráfica dos subtipos de Esclerose Múltipla. Quando os sinais clínicos ultrapassam a linha pontilhada tem-se o estabelecimento da EM. O aparecimento de um caso isolado representa a Síndrome do caso isolado (CIS); já os múltiplos surtos seguidos de melhora representam a Esclerose Múltipla Recorrente Remitente (RR). A linha vermelha de progressão da incapacidade clínica com início após a RR representa a Esclerose Múltipla Secundária Progressiva (SP). A linha azul representa um aumento da incapacidade clínica desde o início dos sintomas, representando a Esclerose Múltipla Primária Progressiva (PP). (Figura adaptada de FILIPPI et al., 2018).

A manifestação clínica decorre das lesões causadas pela resposta inflamatória no SNC, em que células imunes ativadas atuam contra a bainha de mielina e as células que a produzem, os oligodendrócitos, prejudicando o funcionamento normal do SNC (FROHMAN; RACKE; RAINE, 2006). Durante o processo inflamatório, há a quebra da barreira hematoencefálica e aumento da expressão de adesinas no endotélio vascular, o que permite a infiltração de células inflamatórias como linfócitos T auxiliares e citotóxicos, linfócitos B, neutrófilos e monócitos no SNC; culminando no desenvolvimento de um processo inflamatório local (FROHMAN; RACKE; RAINE, 2006).

As células infiltrantes do SNC ativam as células do sistema imune inato local, como astrócitos, macrófagos e células da microglia, com a secreção de citocinas inflamatórias como IL-17 e IFN- γ . Tal ativação é acompanhada da liberação de mediadores inflamatórios,

além de ativar o sistema complemento e liberar espécies reativas de oxigênio (ROS) (FILIPPI et al., 2018, BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018).

Após a infiltração no CNS e estabelecimento de inflamação local, as células T são re-ativadas pelas células apresentadoras de antígenos (APC) locais e a diferenciação dos linfócitos T é iniciada. Os principais perfis encontrados na EM são os Th1 e Th17, com características mais pró-inflamatórias. Para sua ativação são necessárias as citocinas IL-2, IL-6 e TGF- β , e, após polarização, estas células passam a produzir IFN- γ , IL-17, IL-2 e TNF- α . Pode-se destacar o papel fundamental de algumas citocinas, como a IL-2, que auxilia na proliferação dos linfócitos T, a IL-17, que atua no recrutamento de neutrófilos para o SNC e o IFN- γ , responsável pelo aumento da expressão de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II em macrófagos e células da microglia, aumentando a apresentação antigênica e contribuindo com o processo inflamatório (LASSMANN; BRÜCK; LUCCHINETTI, 2001).

Após a instalação da resposta inflamatória mediada pelas células T, há o processo de desmielinização das bainhas de mielina, com a perda de oligodendrócitos e a degeneração dos axônios neuronais, levando à formação das placas focais, que podem ser identificadas e monitoradas por ressonância magnética (MRI) (LASSMANN, 2018). Essas lesões podem ocorrer tanto na matéria branca como na cinzenta, podendo estar ativas ou inativas. As lesões ativas são mais comuns nas fases iniciais da EM, caracterizadas por alta infiltração de células imunes; e as lesões inativas são mais características da fase de progressão contínua, tendo menor presença de células imunes e apresentando uma clara desmielinização, acompanhada de perda axonal e atrofia cerebral (BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018).

Além da formação de lesões, pode ocorrer também o processo de remielinização, que é variável dependendo do paciente e do estágio da doença, sendo relatado como um mecanismo de recuperação do surto. O tratamento também influencia na recuperação do surto, sendo a pulsoterapia - administração intravenosa de corticosteroides - o mais indicado, pois diminui a inflamação no SNC; junto do manejo dos sintomas. Quanto aos tratamentos modificadores da doença, há os de primeira linha, como o INF- β e acetato de glatirâmer; e os de segunda, como o natalizumab e fingolimode (FILIPPI et al., 2018).

O acetato de glatirâmer induz uma resposta linfocitária com característica anti-inflamatória enquanto o INF- β têm ação antiproliferativa e imunomoduladora (FROHMAN; RACKE; RAINE, 2006). Já o natalizumab é um anticorpo monoclonal humanizado que antagoniza o VLA-4, uma integrina expressa em linfócitos T efetores essencial para a transmigração leucocitária. Sua inibição reduz o extravasamento de linfócitos para tecidos

periféricos e reativação no SNC (BENNETT, 2007); o fingolimode, por sua vez, é antagonista do receptor de esfingosina-1-fosfato, presente nos vasos sanguíneos, e que permite a migração de linfócitos para a circulação sanguínea, e, ao ser inibido, evita a sua saída dos órgãos linfóides secundários (CHUN; HARTUNG, 2010).

Devido à complexidade das manifestações clínicas e suas evoluções, estudos em modelos animais são necessários para a compreensão dos mecanismos da patogênese da EM. O modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), é um dos mais utilizados para estudo da EM e consiste na imunização de camundongos com o peptídeo da mielina de oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) e adjuvantes que induzem uma resposta inflamatória e quebra de barreira hemato-encefálica, havendo a autossensibilização dos linfócitos T desses animais contra a proteína da mielina seguida de infiltração no SNC e início da resposta autoimune (COX et al., 2013; LASSMANN; BRADL, 2017).

Nesse modelo tem-se uma encefalopatia inflamatória mediada por células T CD4+, que causam desmielinização e dano aos axônios, principalmente na medula espinal dos camundongos. Apesar de apresentar algumas diferenças com relação à patologia da EM, como menor ocorrência de lesões no encéfalo e produção de anticorpos contra MOG, segundo Lassmann e Bradl (2017), este ainda é o modelo animal mais usado para os estudos sobre os mecanismos moleculares da doença.

Por se tratar de uma doença autoimune, diversos mecanismos podem estar envolvidos no seu desencadeamento, tais como fatores exógenos, como infecções virais e poluição ambiental (HOWARD; TREVICK; YOUNGER, 2016); ou suscetibilidades genéticas, como a dos genes do HLA (*Human Leukocyte Antigen*), sendo os haplótipos HLA DRB1*1501, DQA1*0102 e DQB1*0602 os mais presentes em pacientes com Esclerose Múltipla (DYMENT; EBERS; SADOVNICK, 2004; INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSORTIUM, 2005). Os genes do HLA são responsáveis por codificar as proteínas do MHC humano que apresentarão os antígenos para os linfócitos T, interferindo diretamente na sua ativação e amadurecimento. Uma falha nessa apresentação durante a maturação dos timócitos, precursores dos linfócitos T, durante o processo de tolerância imunológica, pode resultar no desenvolvimento de clones que reconheçam antígenos próprios e proporcionar o início de uma autoimunidade caso eles sejam liberados para a periferia (INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSORTIUM, 2005).

1.2 Tolerância Central

Com o intuito de evitar o reconhecimento de estruturas próprias pelas células do sistema imune e, conseqüentemente, o aparecimento das doenças autoimunes, o organismo se utiliza de um mecanismo conhecido por tolerância imunológica, que visa eliminar ou suprimir as células autorreativas, podendo ser central ou periférica. A tolerância central é necessária para que o desenvolvimento e amadurecimento dos linfócitos T ocorram de modo apropriado, permitindo a sobrevivência dos linfócitos que são tolerantes aos antígenos próprios (TAKABA; TAKAYANAGI, 2017).

Nesse processo, precursores linfoides chegam ao timo como células duplo negativas provenientes da medula óssea, sem apresentar seus correceptores CD4 ou CD8. Essas células começam, então, a modificar a expressão das moléculas CD44 e CD25, e a realizar o processo de recombinação gênica para formação das cadeias do TCR (*T Cell Receptor*), responsáveis pelo reconhecimento de antígenos (PALMER, 2003).

Estes receptores são compostos pela combinação de duas cadeias, que podem ser as cadeias γ e δ , dando origem a uma linhagem de linfócitos T com menor especificidade e prevalência, caracterizando no máximo 5% dos linfócitos totais; ou as cadeias α e β , dando origem à maioria dos linfócitos do organismo. Durante o rearranjo, as cadeias mais complexas (β ou δ) são transcritas primeiramente. Muitas das cadeias formadas não são funcionais, não sendo capazes de interagir com os MHCs de células no timo e, portanto, sofrem apoptose pelo processo de negligência (ABBAS; LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Somente passam a expressar as moléculas CD4 e CD8 os linfócitos com uma cadeia β e uma cadeia pré- α que formem um TCR funcional. Neste estágio há o rearranjo da cadeia α , formando um linfócito TCR $\alpha\beta$ com ambos os correceptores, sendo assim, linfócito um duplo positivo (TOURIGNY et al., 1997).

Em seguida, têm-se o processo de seleção positiva, na qual os linfócitos duplo positivos recebem sinais de sobrevivência e diferenciação caso tenham afinidade pelo MHC apresentado pelas células epiteliais do córtex tímico (cTECs). Este processo é essencial para que, posteriormente, os linfócitos possam reconhecer e se ligar a estrutura do MHC das células periféricas, realizando a sinapse imunológica. Caso não ocorra esse reconhecimento do MHC, a célula recebe sinais que levam à apoptose, impedindo sua maturação e chegada à periferia (DALEY et al., 2017).

Os linfócitos se diferenciam para auxiliares, mantendo o correceptor CD4, caso reconheçam o MCH de classe II, e para citotóxicos, mantendo o correceptor CD8, caso reconheçam o MCH de classe I, induzidos pela atuação de peptídeos das cTECs (DALEY et al., 2017). Já diferenciadas, essas células passam a expressar o receptor de quimiocinas

CCR7 e migram para a medula, onde são expressos os ligantes para esse receptor, o CCL19 e CCL21, pelas células epiteliais da medula tímica (mTECs). As mTECs possuem fatores de transcrição capazes de produzir diversos peptídeos extra-tímicos, ou *Tissue-restricted Antigens* (TRA), sendo exemplos destes fatores o AIRE (*Autoimmune Regulator*) e o Fezf2 (*Fez Family Zinc Finger Protein 2*). Assim, no timo, são expressos peptídeos próprios de diversos órgãos, como a insulina e a mielina, contra os quais os linfócitos não podem ser reativos (TAKABA; TAKAYANAGI, 2017).

Uma interação de alta intensidade entre os receptores dos linfócitos T e o MHC com um antígeno próprio resulta no aumento da sinalização intracelular para a ativação das vias de apoptose, ocorrendo o processo de seleção negativa. Devido ao grande número de células que sofrem apoptose nesse processo, apenas 10% dos linfócitos T gerados na medula óssea alcançam os órgãos linfoides secundários. Além disso, o grande número de células mortas também serve como material de apresentação para os novos timócitos, sendo utilizados na apresentação de peptídeos tanto internos quanto externos (JANEWAY JUNIOR; TRAVERS e WALPORT, 2007).

Ainda, pode ocorrer a formação de linfócitos T reguladores (Tregs), provenientes de células com uma interação intermediária a alta com um complexo de MHC e antígeno próprio. Devido a mecanismos ainda não totalmente elucidados, mas provavelmente relacionados com a presença de IL-2 liberada por células dendríticas (DALEY, S. R. et al, 2017), estas células têm a expressão do fator de transcrição FoxP3 (*Forkhead Box P3*) aumentada e assumem um perfil regulador. Uma vez na periferia, são responsáveis por regular a resposta de linfócitos T autorreativos que tenham escapado do processo de seleção negativa e manter a tolerância periférica (HANDEL; IRANI; HOLLÄNDER, 2018).

Falhas no processo de seleção negativa, seja por uma baixa interação entre TCR e MHC, como ocorre nos haplótipos de HLA mencionados, ou por falta de apresentação de antígenos próprios, como no caso de mutações no gene AIRE; resultam na diminuição da intensidade dos sinais intracelulares responsáveis pela indução de apoptose dos clones autorreativos, o que permite sua passagem para periferia, aumentando a suscetibilidade para o surgimento das autoimunidades (HANDEL; IRANI; HOLLÄNDER, 2018).

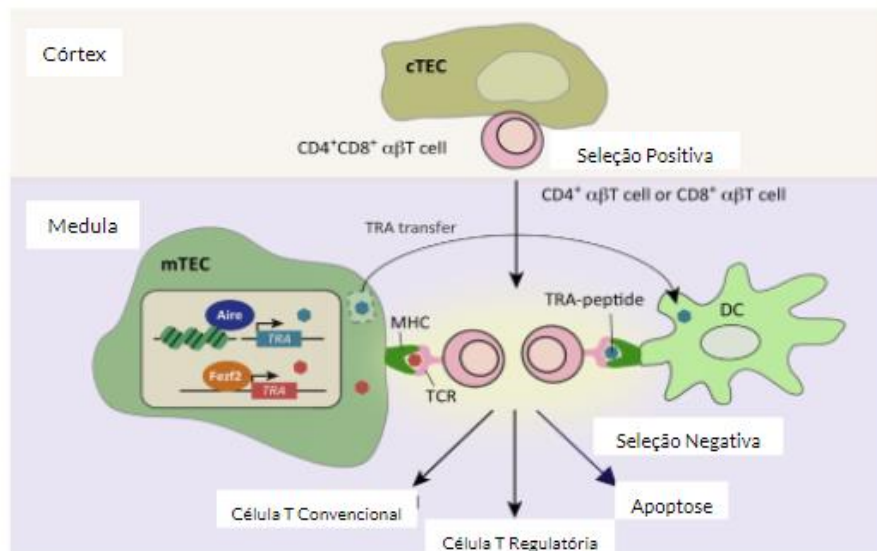


Figura 2. Representação do processo de tolerância central no timo. Os timócitos adentram o timo como duplos negativos. Ao percorrerem o córtex tímico iniciam a recombinação somática do seu TCR seguido da expressão de seus correceptores CD4 e CD8. Um timócito duplo positivo passa pela Seleção Positiva no córtex, interagindo com as cTEC (Células Epiteliais Tímicas Corticais); migrando, depois, para a medula, onde interage com as mTEC (Células Epiteliais Tímicas Medulares), que produzem os antígenos TRA (*Tissue-Restricted Antigen*), e DCs (Células Dendríticas), passando pela Seleção Negativa que resulta em uma célula T convencional, reguladora ou em apoptose. (Figura adaptada de TAKABA; TAKAYANAGI, 2017.)

Para além das interações celulares descritas, diversos fatores solúveis são encontrados no timo e podem influenciar os processos de seleção positiva e negativa. Dentre eles, podemos citar hormônios como o glicocorticoide (MITTELSTADT et al., 2012) e a timoglobulina (NA et al., 2013); e citocinas como a RANKL, que induz a expressão de AIRE pelas mTECs (HIKOSAKA et al., 2008). Além destes, têm-se visto a relevância da interação de neurotransmissores na sinalização das sinapses imunológicas durante a apresentação antigênica no timo, como é o caso da adrenalina, que influencia a diferenciação dos timócitos (LEPOSAVIĆ, et al., 2006), e do glutamato, que influencia a viabilidade dos mesmos durante a seleção negativa (AFFATICATI et al., 2011).

1.3 Glutamato e NMDAr

Sendo o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso, o glutamato tem ação sobre dois tipos de receptores diferentes. São eles os receptores metabotrópicos, ligados à proteína G; e os receptores ionotrópicos, canais de íons permeáveis a sódio e cálcio - AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), Cainato e NMDA (N-metil-D-aspartato) (PACHECO et al., 2007). Dentre estes, o NMDA é o principal receptor glutamatérgico, envolvido tanto com a neuroplasticidade do SNC, principalmente nos processos de memória e aprendizado; como com mecanismos de excitotoxicidade, que

ocorre por sua ativação excessiva, culminando no desbalanço iônico e ativação de vias de apoptose celular (VYKLICKY et al., 2014).

O receptor NMDA é um canal de membrana formado por quatro subunidades. Há o dímero GluN1, de presença obrigatória, em conjunto com uma outra subunidade, que pode ser um homodímero ou um heterodímero, formado por GluN2A-D, GluN3 ou GluN4, sendo o GluN2 o mais comum. Quando não ativado, o receptor fica bloqueado por um íon de magnésio e a sua ativação depende tanto da ligação do glutamato, em conjunto com D-serina ou glicina, como da despolarização da membrana para haver a retirada do bloqueio pelo íon de magnésio (FAN; JIN; WANG, 2014, KAHLFUSS et al., 2014).

Atualmente, tem sido descrito a presença de receptores para neurotransmissores em células que não pertencem ao sistema nervoso (SN). Exemplos destes são a presença de receptores para acetilcolina em monócitos esplênicos, controlando sua resposta inflamatória e produção de TNF- α (ANDERSSON U. e TRACEY K., 2012) e do próprio receptor de NMDA em linfócitos T auxiliares, que atua no aumento da concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio afetando proliferação e sobrevivência destes linfócitos (BOLDYREV; BRYUSHKOVA; VLADYCHENSKAYA, 2012).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a administração da dizocilpina (MK801), um antagonista do receptor NMDA, reduz a infiltração de linfócitos Th1 e Th17 no SNC de camundongos com EAE, assim como a capacidade proliferativa e de síntese de IFN- γ e IL-17 destas células *in vitro*; confirmando que o receptor NMDA tem função na ativação e resposta dos linfócitos T (ROSSATO, 2016).

Em 2011, Affaticati e colaboradores mostraram que, durante a maturação de linfócitos no timo, as células dendríticas tímicas são capazes de, durante a apresentação antigênica, liberar glutamato e que este age no receptor NMDA presente nos timócitos, aumentando o influxo de cálcio para a célula e, como consequência, induz a apoptose pela via de ativação da caspase-3. Contudo, ainda não está claro qual a repercussão dessa sinalização na geração de clones autorreativos e suas consequências nas autoimunidades, principalmente aquelas associadas ao SNC.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar qual influência que os receptores NMDA exercem sob os linfócitos T durante a seleção negativa no timo, e sua repercussão na progressão da EAE. Para tanto, por meio do sistema Cre/Loxp, utilizou-se camundongos *knockout* para o receptor NMDA exclusivamente em linfócitos T (C57BL/6 CD4^{CRE}/Grin^{Flox}), fornecendo uma resposta mais direcionada sobre a influência deste receptor nesse subtipo celular.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência dos receptores NMDA na seleção negativa de timócitos e sua repercussão na Encefalomielite Autoimune Experimental.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar alterações na frequência de células simples positivas no timo e sua viabilidade;
- Verificar a frequência de clones de linfócitos T específicos para MOG₃₅₋₅₅;
- Avaliar a repercussão da ausência do receptor NMDA no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental por meio de escore clínico;
- Quantificar diferenças na produção de citocinas pró-inflamatórias por citometria de fluxo.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este trabalho foram utilizados camundongos *STOCK Tg(Cd4-cre)1Cwi/BfluJ* (<https://www.jax.org/strain/017336>) (C57BL/6-CD4^{CRE}) cruzados com camundongos *B6.129S4-Grin1tm2Stl/J* (<https://www.jax.org/strain/005246>) (C57BL/6-Grin^{Flox}) para geração de camundongos C57BL/6-CD4^{CRE}/Grin^{Flox}. Os experimentos foram realizados com animais com a idade entre 6-12 semanas, provenientes do Biotério de Matrizes de Camundongos, Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos e protocolos utilizados no estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - 103/ 2017.

3.2 Genotipagem dos animais

Para confirmar as modificações genéticas dos camundongos, foram feitas análises de PCR dos genes de interesse a partir do DNA extraído das caudas dos camundongos.

3.2.1 Extração de DNA

Um pedaço da cauda dos camundongos foi cortado e colocado em um tubo cônico de 1,5mL com 400µl de solução de lise (1ml de NaCl 200mM, 1ml de Tris HCL ph 8,0 100mM, 100µl de EDTA 5mM, 200µl de SDS 0,2%, 667µl de proteína K 5g/ml e 7ml de água DPOC) e incubado a 56°C e 750rpm no *Thermomixer* por 2,5 horas ou *overnight*. Depois, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm, por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante

foi transferido para um novo tubo, em que foi adicionado 400µl de isopropanol e homogeneizado manualmente até visualização da nuvem de DNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm, por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, foi feita a lavagem com 500µl de álcool 70% e novamente centrifugado a 12.000rpm, por 5 minutos a 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e as amostras ressuspensas em 50µl de água DPOC para quantificação.

3.2.2 PCR Cre

Para realizar a reação de PCR, foram usados 8µl do mix de corrida, constituído de Buffer 10x (1µl), MgCl₂ (0,28µl), dNTP mix (0,11µl), *Taq Polymerase* (0,04µl), H₂O Milli Q (4,57µl) e 0,5µl de cada primer (IMR 1084, IMR 1085, IMR 7338, IMR 7339). Depois, foram adicionados 100ng de DNA da amostra de interesse em uma concentração de 50ng/ml, seguida pela corrida no termociclador baseada no *Jackson Laboratory*.

Comando	Temperatura do Ciclo	Tempo
1	94°C	3 minutos
2	94°C	30 segundos
3	51,7°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	Ir para 2 - 35x	
6	72°C	2 minutos
7	4°C	<i>On hold</i>

Ao final da reação de PCR, as amostras foram colocadas para correr em um gel de agarose a 3% contendo o corante de DNA *Sybr Safe (Synapse®)* em concentração de 1:10.000. No final da corrida, o gel foi levado para um transluminador para visualização das bandas, sendo o controle na altura de 354bp e o Cre na altura de 100bp. Neste protocolo, não é possível diferenciar animais homozigotos e heterozigotos, pois a apresentação das bandas é a mesma.

3.2.3 PCR Grin

Para realizar a reação de PCR, foram usados 8µl do mix de corrida, constituído de Buffer 10x (1µl), MgCl₂ (0,28µl), dNTP mix (0,11µl), *Taq Polymerase* (0,04µl), H₂O Milli Q (4,57µl) e 0,5µl de cada primer (11467 e 11466). Depois, foram adicionados 100ng de DNA da amostra de interesse em uma concentração de 50ng/ml, seguida pela corrida no termociclador baseada no *Jackson Laboratory*.

Comando	Temperatura do Ciclo	Tempo
1	94°C	2 minutos
2	94°C	20 segundos
3	65°C (-0,5°C por ciclo)	15 segundos
4	68°C	10 segundos
5	Ir para 2 - 10x	
6	94°C	15 segundos
7	50°C	15 segundos
8	72°C	10 segundos
9	Ir para 6 por - 28x	
10	72°C	2 minutos
11	10°C	<i>On hold</i>

Ao final da reação de PCR, as amostras foram colocadas para correr em um gel de agarose a 3% contendo o corante de DNA *Sybr Safe (Synapse®)* em concentração de 1:10.000. No final da corrida, o gel foi levado para um transluminador para visualização das bandas, sendo a do animal controle *wild* na altura de 250bp e do Flox na altura de 400bp. Neste protocolo, o animal heterozigoto apresenta duas bandas de menor intensidade em ambas alturas.

Código	Descrição	Sequência
11466	Gin1 reverse	GTG CTG GGA TCC ACA TTC AT
11467	Gin1 Forward	AAA CAG GGC TCA GTG GGT AA
IMR 1084	Cre Transgene Forward	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
IMR 1085	Cre Transgene Reverse	GTGAAACAGCATTGCTGCTCACTT
IMR 7338	Cre Endogenous Control Forward	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
IMNR 7339	Cre Endogenous Control Reverse	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATC C

Para os experimentos, foram utilizados camundongos homozigotos *Grin1^{flox}* negativos para a presença do gene Cre como controles, e camundongos homozigotos *Grin1^{flox}* positivos para a presença do gene Cre.

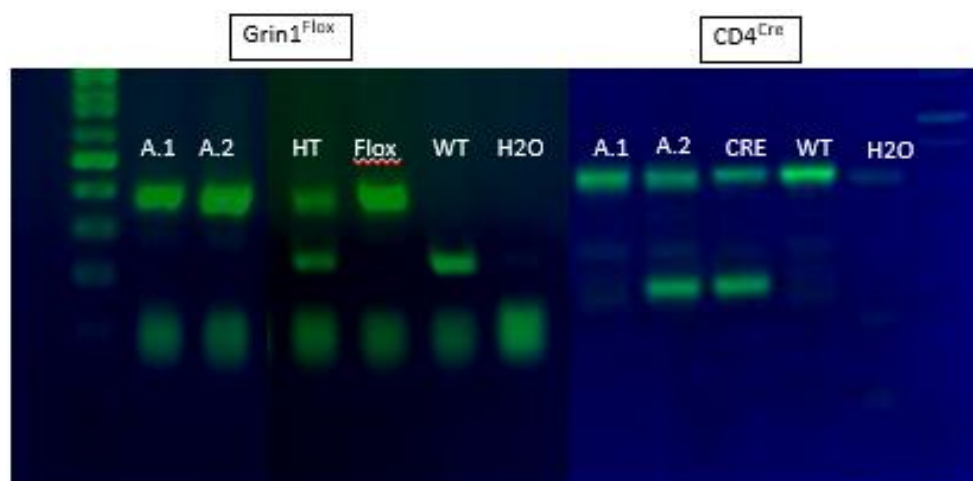


Figura 3. Genotipagem para os genes *Grin1* e *Cre*. Resultados da corrida em gel de agarose para genotipagem dos animais para os genes *Grin1^{Flox}*, à esquerda, e *Cre*, à direita. Representação do animal 1 (controle, só *Grin1^{Flox}*), animal 2 (CDNR1 KO, positivo para *Cre* e *Flox*) e controles positivos.

3.3 Citometria de fluxo

Foram plaqueadas 1×10^6 células e posteriormente ressuspensas em 25µl de Fc Block (1:100) para impedir a ligação inespecífica, sendo a incubação realizada por 20 minutos a 4°C. Logo após este processo as células foram centrifugadas a 450g, por 5 minutos a 4°C e ressuspensas com os anticorpos específicos: anti-CD4 FITC, anti-CD4 PERCP, anti-CD8 PE, anti-CD8 PERCP, anti-Vβ11 PE, na diluição de 1:100. As células foram então incubadas pelo período de 20 minutos a 4°C, seguidas de duas lavagens com 200µl de PBS e ressuspensas em 200µl de PBS.

Para marcação intracelular, foi usado o kit *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience®). As células foram centrifugadas, tiveram o sobrenadante descartado e foram vortexadas. Adicionou-se 50µl da solução *Foxp3 Fixation/Permeabilization* (combinação de uma parte de *Fixation/Permeabilization concentrate* e 3 partes de *Fixation/Permeabilization diluente*), e foi deixado por 20 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Depois, as células foram ressuspensas em 150µL do *Permeabilization Buffer* 1x e centrifugadas a 450g, por 5 minutos a 22°C. Em seguida o anticorpo anti-FOXP3 APC diluído em solução *Permeabilization Buffer* 1x (1:100) foi adicionado e as células foram então incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Posteriormente, adicionou-se 200µL do *Permeabilization Buffer* 1x para serem centrifugadas com os mesmos parâmetros anteriores, terem o sobrenadante descartado e serem ressuspensas em 100µl do *Flow Cytometry Staining Buffer* para leitura.

A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo C6® (BD Pharmingen®) ou Attune® (Thermo Fisher Scientific®).

3.4 Ensaio de viabilidade

Para análise da viabilidade dos timócitos foi feita uma citometria de fluxo com marcação por anexina V e iodeto de propídeo (IP). Como a anexina V tem afinidade pela fosfatidilserina e o IP marca células com perda de integridade de membrana, essa marcação permite diferenciar células viáveis, em apoptose inicial, e em apoptose tardia ou necrose. Após maceração do timo, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de ligação (10mM Hepes pH 7,4; 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂ e 1,8mM CaCl₂) contendo anexina V FITC e PI PERCP na diluição 1:20 e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após esse período, foi acrescentado o volume de 80µl do tampão de ligação, seguida da análise no citômetro de fluxo FACS Accuri C6® (BD Pharmingen®).

3.5 Encefalomielite Autoimune Experimental - EAE

Camundongos fêmeas C57BL/6 CD4CRE/Grin^{Flox} receberam uma injeção subcutânea de 150µg de MOG₃₅₋₅₅ (mielina de oligodendrócito de sequência MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, sintetizado por Proteimax Biotecnologia - São Paulo - SP - Brasil) emulsificado em CFA (*Complete Freund Adjuvant*) (v/v), contendo 500µg de *M. tuberculosis* H37Ra (BD®). Após a injeção com MOG₃₅₋₅₅, os camundongos receberam duas doses de 200ng da toxina de *Bordetella pertussis* por via intraperitoneal, nos períodos de 0 e 48 horas após a imunização. Todos os animais foram acompanhados diariamente por 15 a 45 dias e o grau de doença foi dado como descrito a seguir: 0 - Nenhuma doença, 1 - Cauda flácida, 2 - Dificuldade de locomoção, 2,5 - Patas traseiras parcialmente paralisadas, 3 - Uma pata traseira completamente paralisada, 3,5 - Ambas patas traseiras completamente paralisadas, 4 - Paralisia completa das patas traseiras junto à paralisia parcial das patas dianteiras, 5 - Paralisia completa ou morte.

3.6 Extração de células do SNC

Após sacrifício dos camundongos, o cérebro e a medula espinhal foram dissecados, dissociados, colocados em tubos cônicos de 15ml contendo uma solução de 2,5mg/ml de colagenase D (Roche®) (10mg de colagenase D em 4ml de DMEM) e mantidos por 45 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Após a incubação, as amostras tiveram a atividade da colagenase bloqueada por 10ml de solução de bloqueio (HBSS sem Ca/Mg contendo 2mM de EDTA). Posteriormente, o tecido foi processado em *cell strainers* e transferido para novos tubos cônicos de 15ml. Os tubos foram então centrifugados a 450g por 5 minutos a 4°C, e o pellet formado foi ressuspendido em 6ml de Percoll (Sigma®) a 25%. Esta suspensão foi lentamente vertida em novos tubos de 15ml contendo 2ml de Percoll 75%

seguinte-se de centrifugação a 900g por 20 minutos a 22°C com o freio desativado. Ao fim da centrifugação, a fase superior, composta por uma grande concentração de mielina, foi coletada por sucção e desprezada e o anel, formado por células mononucleares na intersecção das soluções de Percol 25% e Percol 75%, foi coletado e transferido para novos tubos de 15ml contendo DMEM gelado. As células foram centrifugadas a 450g por 5 minutos a 4°C e o pellet foi ressuspendido em 1ml de meio DMEM completo (Meio DMEM Hans F12 contendo 10% soro fetal bovino e 1% de vitaminas, aminoácidos não essenciais, L-glutamina, piruvato de sódio e penicilina/estreptomicina), contabilizadas pelo citômetro de fluxo FACS Accuri C6® (Becton & Dickinson, Mountain View, CA) e plaqueadas de acordo com os experimentos a serem realizados.

3.7 Ensaio de citocinas por *Cytometric Bead Array* - CBA

As células do SNC foram obtidas conforme descrito e plaqueadas a 5×10^5 células/poço em placas de 96 poços de fundo redondo. Para a detecção de citocinas, as células foram mantidas em meio DMEM Completo e estimuladas ou não com anti-CD3 (1ug/ml-Biolegend®) e anti-CD28 (2µg/ml-Biolegend®) por 5 dias. Após este período o sobrenadante foi coletado e as citocinas avaliadas por meio do kit *Cytometric Bead Array for mouse Th1/Th2/Th17 populations* (BD®), seguindo as especificações do fabricante. A aquisição foi feita no citômetro de fluxo FACS Accuri C6® (Becton & Dickinson, Mountain View, CA) e analisado pelo FCAP Array Software (BD®).

3.8 Histologia das medulas espinais

Os camundongos que tiveram suas medulas espinais usadas para a histologia foram sacrificados pela administração dos anestésicos cetamina e xilazina na circulação sanguínea por via retro-orbital. Em seguida, foi feita a perfusão destes animais primeiramente com PBS (para minimizar a contaminação com células circulantes) e depois com paraformaldeído 4% (para fixação do tecido). Posteriormente, suas medulas foram retiradas separando-se a espinha óssea do crânio e extraíndo a medula espinal, sem danificá-la, por meio da retirada das vértebras por ação mecânica e auxílio de pinças cirúrgicas. As partes distais das medulas espinais foram cortadas, e mantidas em paraformaldeído a 4% *overnight* em geladeira. Depois, foram crioprotegidas em uma solução de sacarose a 30% em PBS à 4°C e congeladas em gelo seco. As amostras foram seccionadas no plano coronal em tamanhos de 20µm em um criostato semiautomático (1850 UV, Leica®) e montadas em *superfrost plus slides* (VWR International®). As amostras foram deixadas para secar por 48 horas, lavadas com água destilada por 2 minutos, incubadas com hematoxilina de Harris por 2 minutos e então lavadas em água corrente

para remover resíduos em excesso por 4 minutos. Em seguida, foram incubadas em eosina por 2 minutos, desidratadas em solução etanólica, diafanizadas com uma solução de xilol por 5 minutos e cobertas com *D.P.X. Mounting medium* (Sigma®). Imagens foram adquiridas com um *EVOS XL Core Microscope* (Thermo®).

3.9 Análise estatística

A análise dos escores clínicos de EAE foram analisados pelo *two-way ANOVA* teste, seguido pelo *Bonferroni post-test*. Outras análises utilizaram o *one-way ANOVA* seguido pelo *Tukey* ou *T-test*. Todas as análises foram feitas no software *Graphpad Prism 7®*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.0 RESULTADOS

4.1 Análises em camundongos *naive*

A primeira análise feita foi para verificar se a ausência do receptor NMDA influenciava de alguma maneira a seleção negativa de timócitos, observando como as subpopulações das diferentes fases de amadurecimento se distribuiriam no timo. Verificou-se, nas análises por citometria de fluxo, um aumento da frequência de timócitos simples positivos nos animais $CD4^{CRE}Grin^{flox}$ ($CD4+$ NMDA KO) em relação aos controles, como é possível observar na figura 4.

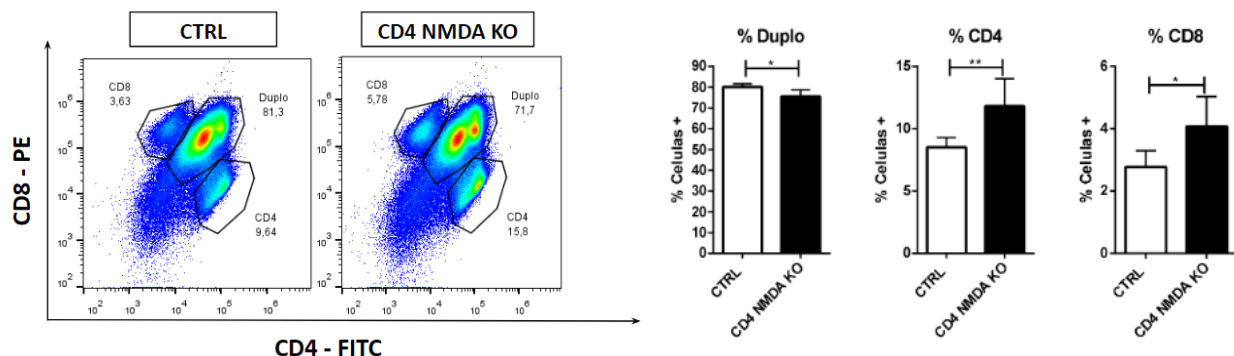
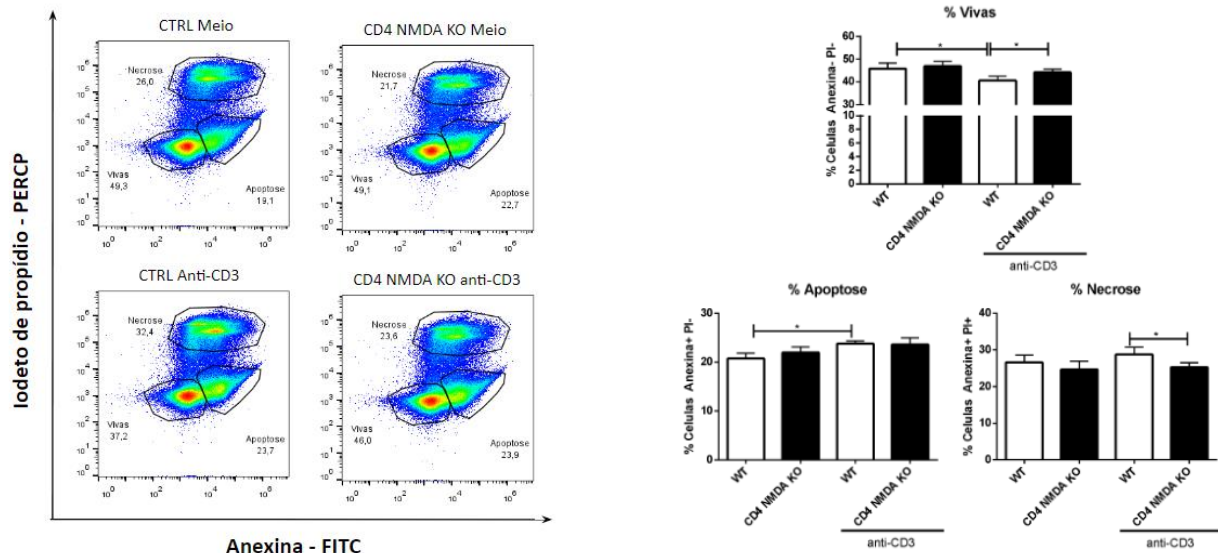


Figura 4. Animais $CD4+$ NMDA KO têm maior frequência de células simples positivas no timo. Análise por citometria de fluxo das células tímicas. À esquerda, estratégia de gates de células para as populações $CD8+$, $CD4+$ e duplo positivas. À direita, quantificação das populações escolhidas marcadas por $CD8-PE$, $CD4-FITC$ e $CD4-FITC+CD8-PE$ (Duplo) em timócitos de animais CTRL (C57BL6 $Grin^{flox}$) e $CD4$ NMDA KO (C57BL6 $CD4^{CRE};Grin^{flox}$). Análise estatística T-student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A fim de avaliar se o aumento de células simples positivas estava relacionado com uma maior viabilidade celular, foi feita uma marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP). A fim de mimetizar a sinalização de ativação do TCR que ocorre durante a seleção negativa, adicionou-se um grupo estimulado com anti- $CD3$ por 24 horas.

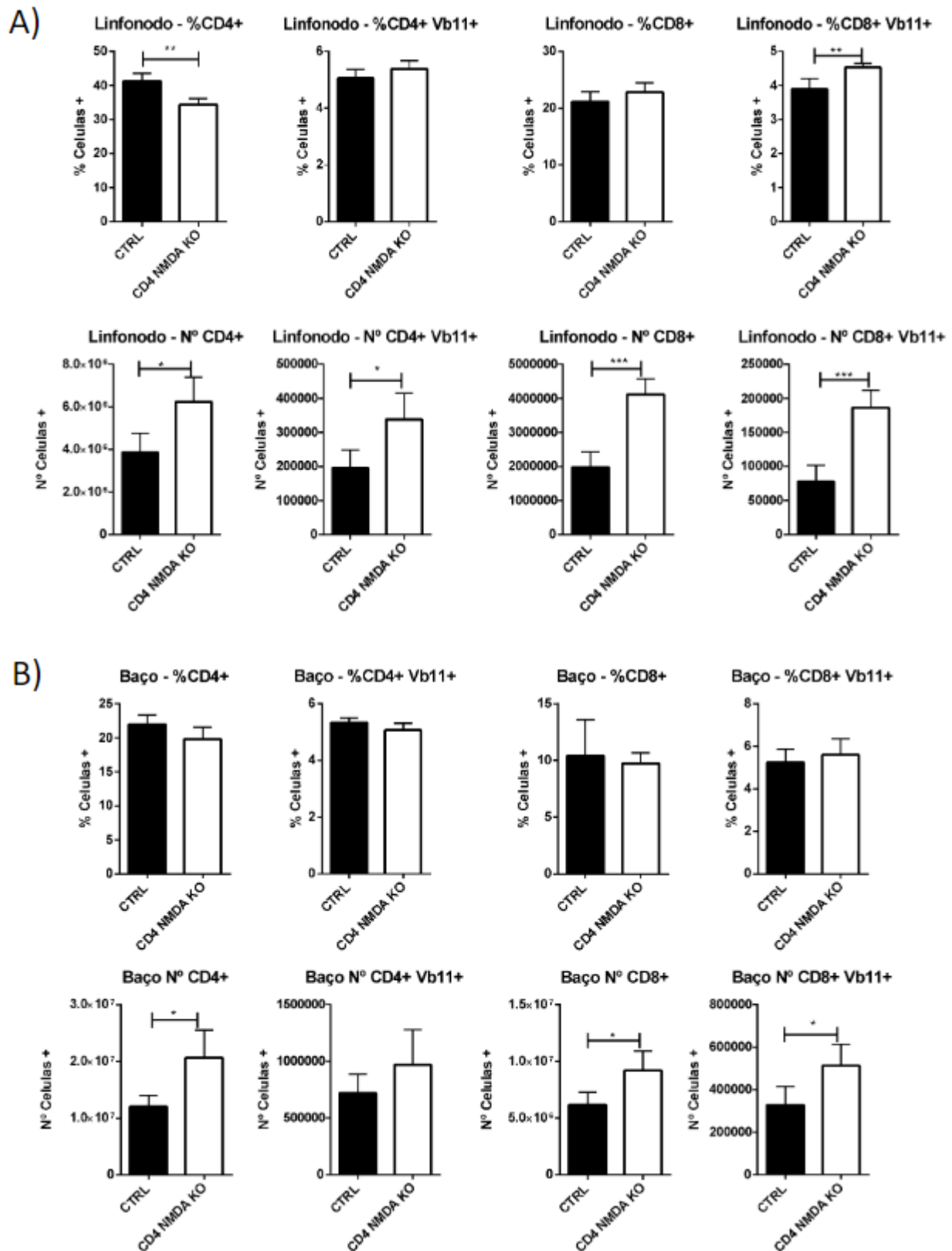
Os resultados mostram que o estímulo por CD3 diminui a viabilidade celular nos animais controle, porém este fenômeno não pode ser visualizado nos animais CD4+ NMDA KO, o que pode ser verificado com a menor proporção de células com marcação para necrose, indicando uma diminuição na amplitude do processo de morte celular nesses animais em relação aos animais controle (Figura 5).

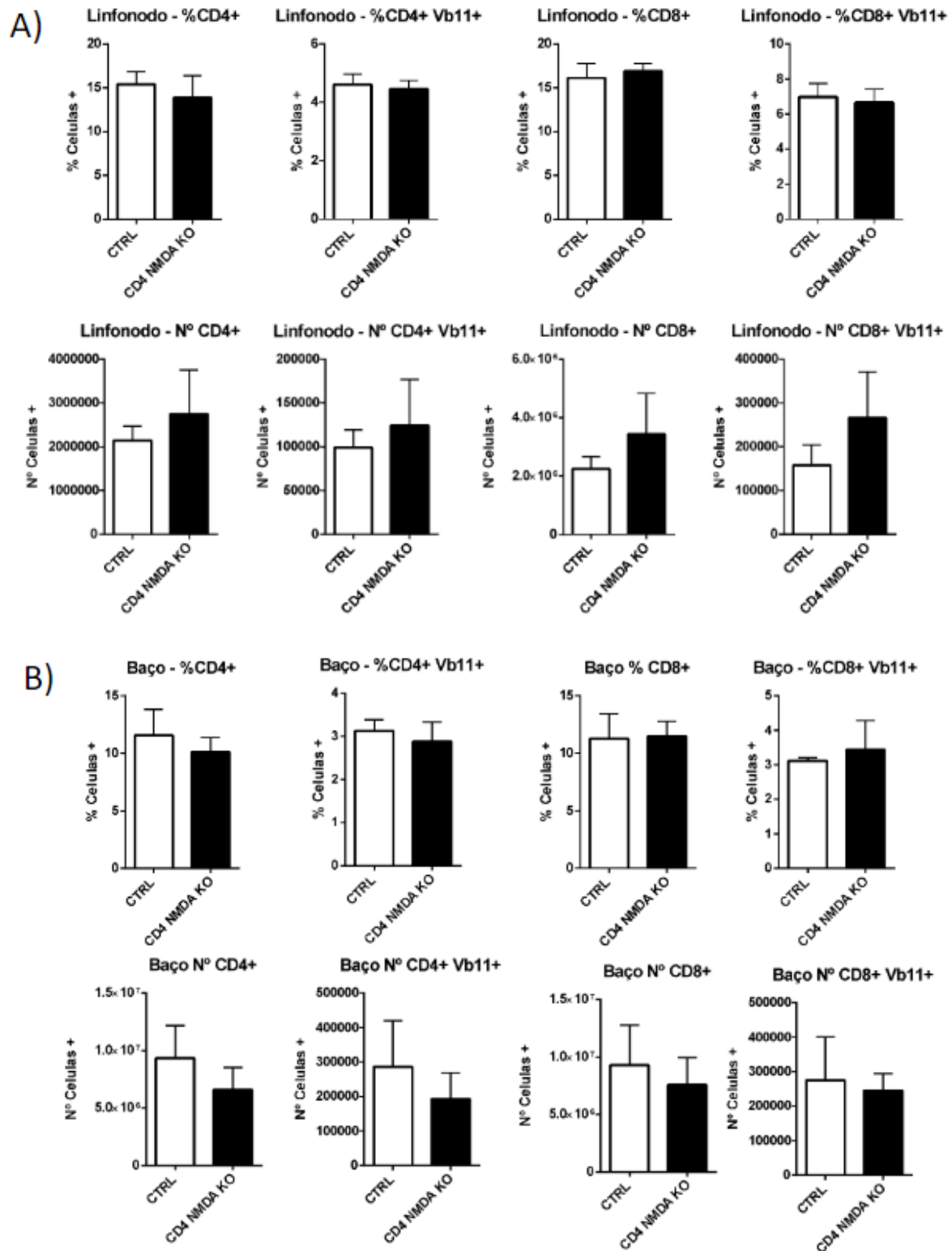


Figuras 5. Animais CD4+ NMDA KO apresentam menor morte celular após ativação com anti-CD3. Análise no citômetro de fluxo, à esquerda, com os gates marcando necrose (Iodeto de Propídio-PERCP+ Anexina-FITC+), apoptose (Anexina-FITC+) e células vivas (Iodeto de Propídio-PERCP- Anexina-FITC-) estando somente em meio celular ou tendo sido ativadas por anti-CD3 (1ug/ml) por 24h, e as porcentagens, à direita, de ambas marcações em WT (C57BL6 Grin1^{flox}) e CD4 NMDA KO (C57BL6 CD4^{CRE}:Grin1^{Flox}). Análise estatística One way anova, *p<0,05, ** p<0,01.

O próximo passo foi observar as alterações causadas pela falta do receptor NMDA nos órgãos linfoides secundários, como baço e linfonodos, para averiguar a extensão dos fenômenos observados. Foram analisados camundongos com duas idades distintas: 6 e 10 semanas, e pode-se observar que os resultados obtidos em relação à quantidade de células de cada subtipo de linfócito dependem do tempo de vida dos animais.

Os animais com 6 semanas de idade apresentam um aumento das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+, em conjunto com o marcador Vβ11 (cadeia β do TCR específica para MOG₃₅₋₅₅), nos órgãos periféricos - linfonodos subaxilares, inguinais superficiais e periaórticos, e baço - neste último sendo uma tendência de aumento de células T CD4+Vβ11+, apenas. Isto é observado principalmente no número total de células quando comparado com os animais controle, não havendo alteração na porcentagem celular em ambos os grupos (Figura 6).

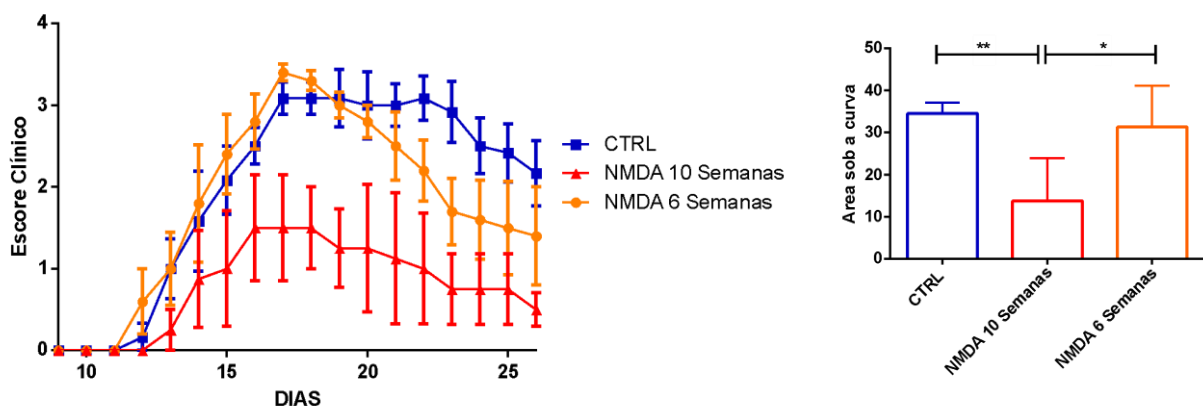




Já os animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas não apresentam aumento no número de linfócitos, seja nos linfonodos (Figura 7A), ou no baço (figura 7B). Tal fenômeno indica que o efeito do aumento do número de células T devido à ausência do receptor NMDA não é permanente. A partir desses resultados, avaliou-se o efeito das alterações nos animais com EAE em ambos períodos, de 6 e 10 semanas, para verificar a influência dessa mudança nos linfócitos dos animais em uma doença autoimune.

4.2 Análises em camundongos com EAE

Ao induzir a EAE, a resposta clínica dos camundongos CD4+ NMDA KO de 6 semanas foi parecida com a dos animais controle, iniciando os sinais clínicos por volta do décimo dia e tendo o pico da doença próximo ao 17º dia - algo esperado de acordo com a evolução da doença; porém, houve uma regressão mais acelerada nos animais CD4+ NMDA KO. Já nos animais com 10 semanas, observou-se uma maior resistência à doença, com sinais clínicos reduzidos. Vale destacar que não há diferença na área sob a curva dos animais de 6 semanas em relação aos controles (Figura 8).



Figuras 8. Escore clínico dos animais controle e animais CD4+ NMDA KO, com duas idades diferentes. Avaliação da evolução clínica dos camundongos, à esquerda, com escores clínicos de 0 a 5 a partir do dia da imunização (0) até o dia 25. À direita, área sob a curva de cada grupo de animais, CTRL (C57BL6 Grin1^{flox}) e CD4 NMDA KO (C57BL6 CD4^{CRE}:Grin1^{Flox}) com 6 e 10 semanas. Análise estatística One way anova, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A fim de compreender os mecanismos envolvidos nas diferenças clínicas encontradas entre os animais, avaliou-se a resposta imune no SNC. Com análises histológicas da medula espinal marcadas pela coloração de hematoxilina e eosina, observou-se menor infiltrado celular na medula espinal dos camundongos CD4+ NMDA KO de ambas idades, porém, nos animais de 10 semanas é possível verificar um infiltrado ainda menor, caracterizado por um aglomerado de células nas bordas dos cortes de medula espinal (Figura 9).

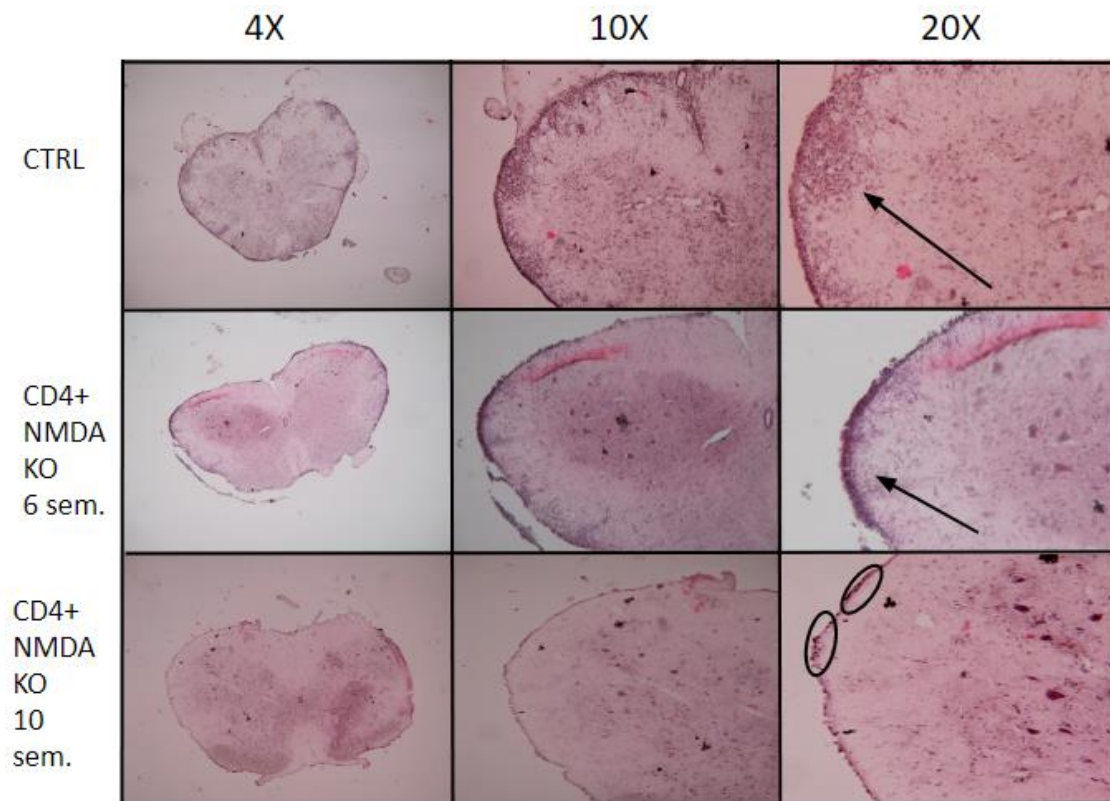


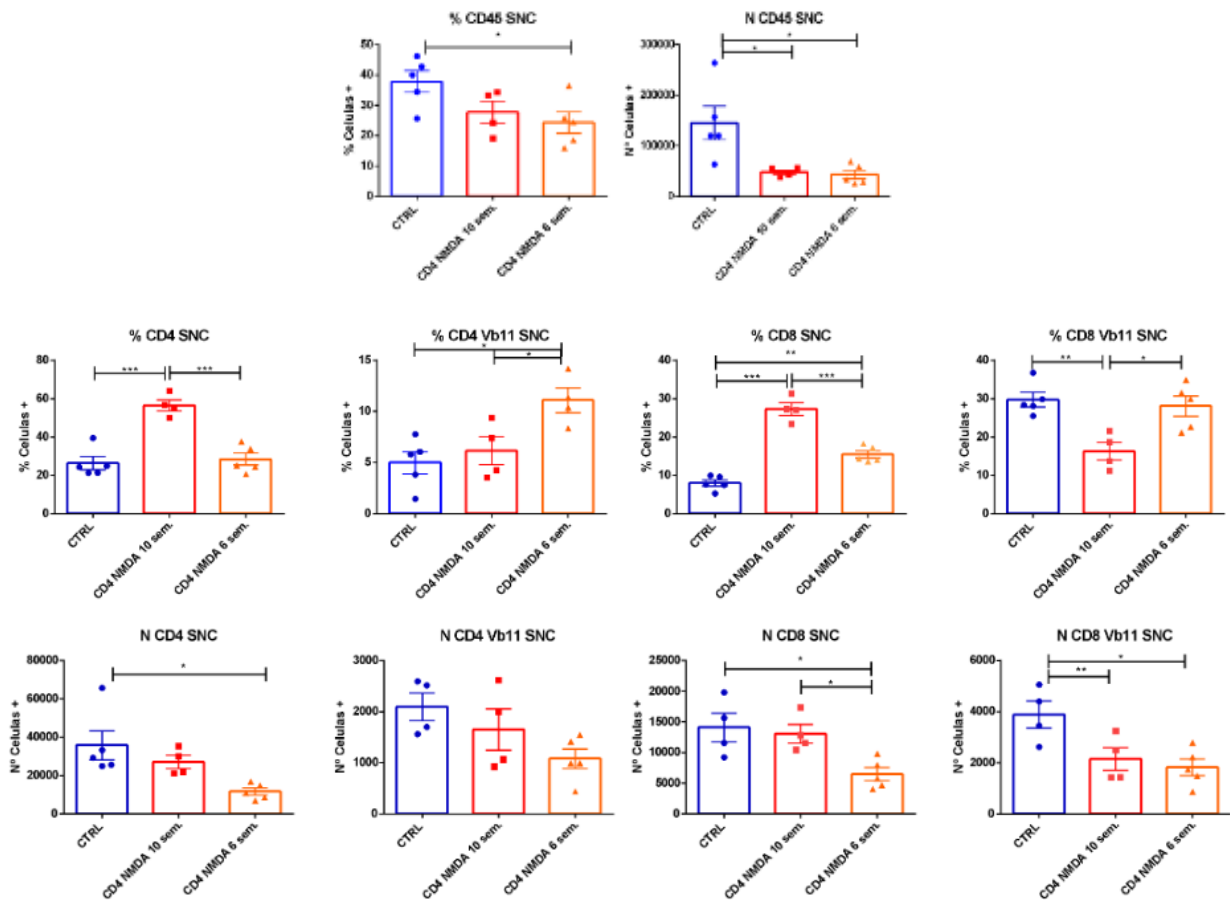
Figura 9: Histologia da medula espinal, em diferentes aumentos. Cortes coronais das medulas dos animais CTRL (C57BL6 Grin1^{flox}) e CD4 NMDA KO (C57BL6 CD4^{CRE}:Grin1^{Flox}) com 6 e 10 semanas, nos aumentos de 4, 10 e 20 vezes. Com 6 semanas, há uma infiltração celular (indicado pelas setas) ainda significativa, mesmo que menor do que a dos animais controle, mas animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas quase não apresentam infiltrados celulares (destacados).

Para avaliar diretamente a resposta dos linfócitos nestes animais, foram realizados ensaios de citometria de fluxo. Ao quantificar as células extraídas do SNC, percebeu-se um menor número de leucócitos infiltrantes, marcados com CD45, nos animais de 6 e 10 semanas (Figura 10), o que corrobora o menor infiltrado celular verificado na histologia.

Ao quantificar os subtipos de linfócitos, foi possível observar que os animais com 6 semanas apresentaram um número menor de linfócitos T CD4+ em relação aos animais controle, enquanto os animais de 10 semanas apresentam apenas uma tendência deste fenômeno; porém, com relação à porcentagem das células infiltrantes, os animais de 10 semanas apresentam uma maior proporção de células T CD4+ em relação aos outros grupos. Quando se verifica as células T CD8+, há a diminuição do número de células em animais mais novos e, como visto nos linfócitos T CD4+, há um aumento na porcentagem de células T CD8+ nos animais de 10 semanas.

Dentre os resultados, o que chama a atenção é a diferença na frequência de células autorreativas ao MOG (Vβ11+) entre os grupos. Nos animais de 6 semanas observamos um aumento na proporção destas células dentro do grupo dos linfócitos T CD4+ em relação aos animais controle. Por sua vez, apesar do aumento na frequência de células CD4+ e

CD8+, os animais de 10 semanas apresentaram uma proporção igual de células CD4+V β 11+ em relação ao grupo controle e uma menor porcentagem de CD8+V β 11+ em comparação aos demais grupos (Figura 10).



Figuras 10. Animais CD4+ NMDA KO de 6 semanas apresentam maior reatividade ao MOG em células T CD4+ no SNC. Avaliação da porcentagem e números totais de células TCD45+, T CD8+ e CD4+ específicas ou não para MOG (V β 11+), por citometria de fluxo em camundongos CTRL (C57BL6 Grin1^{flox}) e CD4 NMDA KO (C57BL6 CD4^{CRE}:Grin1^{flox}) com 6 e 10 semanas. As células foram extraídas do SNC. Análise estatística One way anova, *p<0,05, ** p<0,01.

Foram quantificadas, também, as células apresentadoras de antígenos (APCs) do SNC (Figura 11), para verificar seu estado de ativação. Foi observado que, nos animais CD4+ NMDA KO de 6 semanas, há menos células CD11b+, marcador de células da microglia e monócitos, do que nos animais de 10 semanas e nos controles. Apesar de estarem em maior quantidade nos animais mais velhos, nestes há menor expressão do correceptor CD86+ e de MCH II em relação aos animais de 6 semanas e controle, o que indica menor ativação das APCs.

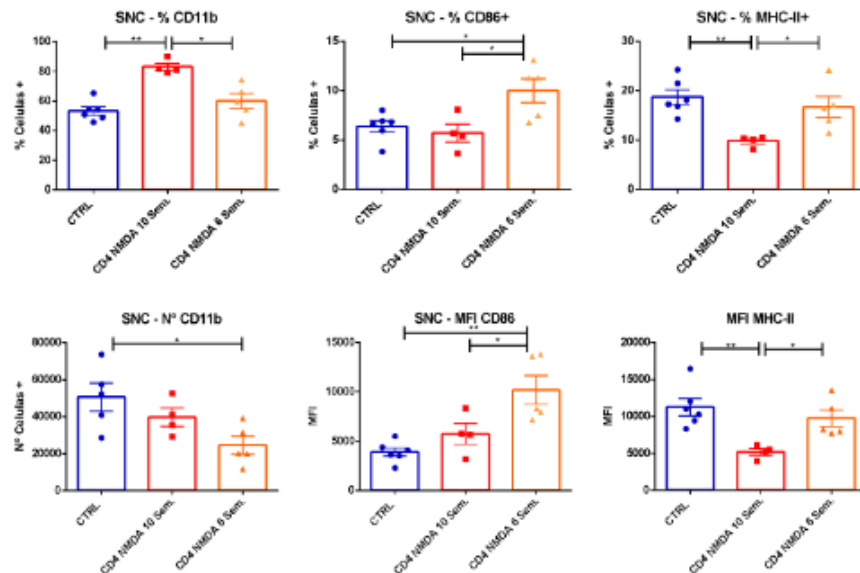


Figura 11. Animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas apresentam APCs menos ativadas no SNC. Avaliação da porcentagem e números totais de APCs CD11b+, com CD86 ou MHCII, por citometria de fluxo em camundongos CTRL (C57BL6 Grin1^{flox}) e CD4 NMDA KO (C57BL6 CD4^{CRE}:Grin1^{Flox}) com 6 e 10 semanas. As células foram extraídas do SNC. Análise estatística One way anova, *p<0,05, ** p<0,01.

Ao analisar o perfil de citocinas liberado pelas células do SNC re-estimuladas *in vitro*, com ou sem anti-CD3 e anti-CD28, nos animais de 10 semanas vê-se uma tendência de menor expressão de citocinas como IL-17, IL-10, IFN- γ e TNF- α , além de maior expressão de IL-6, o que também é encontrado em animais de 6 semanas.

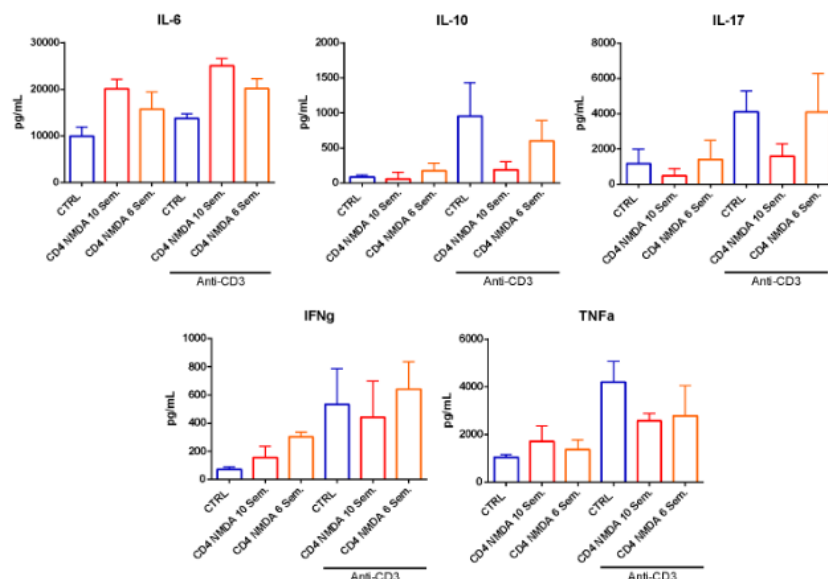
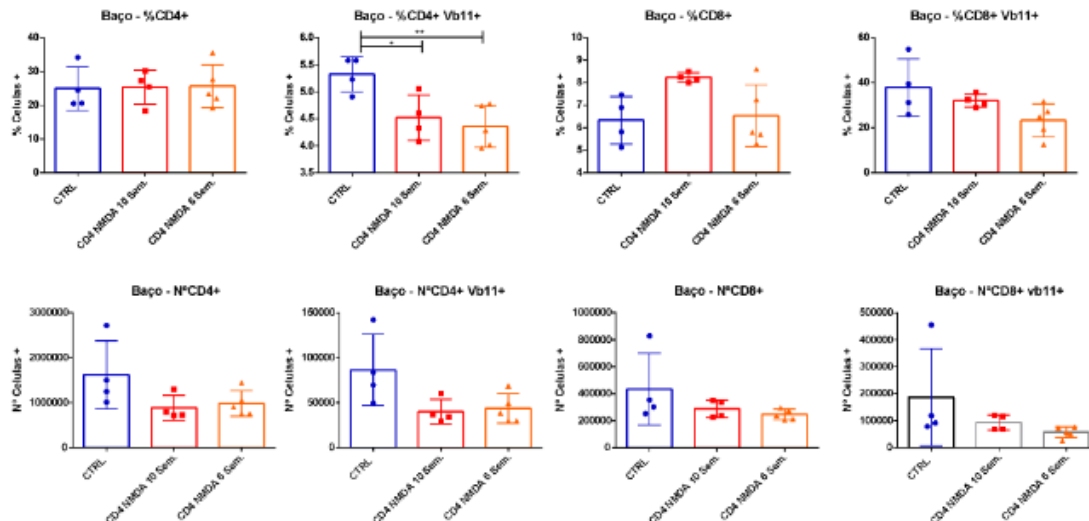


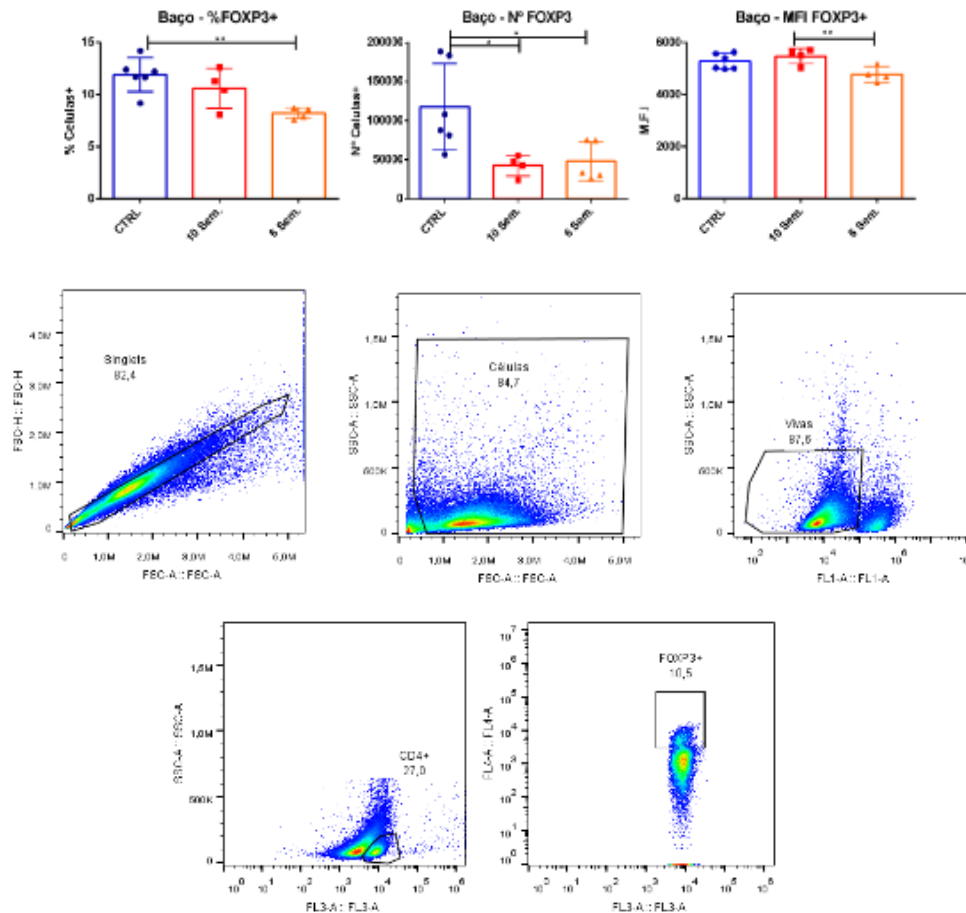
Figura 12. Animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas apresentam diferenças mais acentuadas na expressão de citocinas. Avaliação da concentração de citocinas por citometria de fluxo em camundongos CTRL (C57BL6 Grin1^{flox}) e CD4 NMDA KO (C57BL6 CD4^{CRE}:Grin1^{Flox}) com 6 e 10 semanas. As células foram extraídas do SNC e mantidas em cultura celular por 5 dias, sem ou com o estímulo por anti-CD3 e anti-CD28. Análise estatística One way anova, *p<0,05, ** p<0,01.

Análises no baço mostraram resultados com poucas diferenças entre os grupos, com um destaque maior para animais CD4⁺ NMDA KO apresentando menor proporção de linfócitos T CD4⁺ autorreativos ao MOG, com a proporção geral de T CD4⁺ praticamente inalterada. Animais de 10 semanas apresentaram, ainda, uma tendência de aumento na proporção de células T CD8⁺, ainda que com frequência reduzida de autorreativos ao MOG (Figura 13).



Figuras 13. Animais CD4⁺ NMDA KO de 10 semanas apresentam menos células reativas ao MOG na periferia. Avaliação da porcentagem e números totais de células T CD8⁺ e CD4⁺, específicas ou não para MOG (Vβ11⁺), por citometria de fluxo em camundongos CTRL (C57BL6 Grn1^{flox}) e CD4 NMDA KO (C57BL6 CD4^{CRE}:Grn1^{Flox}) com 6 e 10 semanas. As células foram extraídas do baço. Análise estatística One way anova,, *p<0,05, ** p<0,01.

Também na periferia, os animais CD4⁺ NMDA KO apresentaram uma tendência de menor número de linfócitos T Reguladores (Tregs), caracterizados pela marcação positiva para o fator de transcrição FoxP3, em relação aos animais controle (Figura 14). Ao observar os grupos separadamente, vê-se que o grupo de 6 semanas apresentou uma menor distribuição destas células, bem como uma expressão menor do fator de transcrição FoxP3 por célula em relação aos animais de 10 semanas - o que pode ser observado a partir do MFI (*Median Fluorescence Intensity*) (Figura 14).



Figuras 14. Animais CD4+ NMDA KO de 6 semanas apresentam menos FoxP3. Avaliação da porcentagem, números totais e MFI da expressão de FoxP3 em linfócitos T por citometria de fluxo em camundongos CTRL (C57BL6 Grin1^{fllox}) e CD4 NMDA KO (C57BL6 CD4^{CRE}:Grin1^{fllox}) com 6 e 10 semanas e a estratégia de gate utilizada para avaliação das células Treg (abaixo), sendo seleção de Singlets, Células, Vivas, CD4+ e FOXP3+. As células foram extraídas do baço. Análise estatística One way anova, *p<0,05, ** p<0,01.

Assim, vê-se que animais CD4+ NMDA KO têm alterações na maturação dos timócitos em relação à proporção de subtipos de linfócitos encontrados no timo; fenômeno observado também na periferia de animais CD4+ NMDA KO de 6 semanas, mas não em animais de 10 semanas. Com isso, animais CD4+ NMDA KO de diferentes idades apresentam respostas à EAE também diferenciadas. De forma geral, há menor ativação dos linfócitos T frente à EAE, mas a infiltração celular no SNC, a reatividade linfocitária e a capacidade de ativação de APCs são mais pronunciadas na idade de 6 semanas, em contraste com a proporção de células Treg e sua capacidade reguladora, que se apresenta mais evidente em animais de 10 semanas.

5.0 DISCUSSÃO

A Esclerose Múltipla é uma doença neurodegenerativa com mecanismos patofisiológicos ainda não totalmente elucidados, tendo origem multifatorial com fatores genéticos e ambientais (BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018). Estudos em modelos animais se fazem muito importantes para melhor compreensão da sua evolução e busca por alternativas de tratamento (FILIPPI et al., 2018). Dentre estes modelos, um dos mais usados é o de Encefalomielite Autoimune Experimental (LASSMANN; BRADL, 2017), com uma evolução de encefalopatia aguda, monofásica, auto resolutive e de perfil inflamatório causado principalmente por linfócitos T CD4+ (BITTNER et al., 2014).

Sua indução pode ser passiva, com transferência de células T e/ou anticorpos autorreativos; ou ativa, com a utilização de um antígeno do SNC, como a proteína de mielina, em conjunto com adjuvantes para estimular a resposta inflamatória. Apesar de induzir uma desmielinização primária escassa, com desmielinização proveniente, em sua maioria, da perda de oligodendrócitos, e ter, portanto, uma fisiopatologia diferente da EM (LASSMANN; BRADL, 2017); a sensibilização ativa com MOG₃₅₋₅₅, CFA (Adjuvante Completo de Freud) e toxina pertussis é muito utilizada para o estudo de mecanismos moleculares da EAE e foi o modelo utilizado neste trabalho.

Sabe-se que há grande participação do subtipo de linfócitos Th17, além dos Th1, na encefalopatia da EAE. Contudo, o impacto do microambiente do SNC na modulação da resposta linfocitária ainda é pouco compreendido. Nos últimos 20 anos, novos estudos têm focado no papel de neurotransmissores atuando na resposta imune, inclusive durante a EAE (FILIPPI et al., 2018, BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018; PACHECO et al., 2007). Na mesma linha de raciocínio, nosso grupo se perguntou como o glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, poderia modular a resposta imune a partir da sinalização em receptores NMDA (ROSSATO, 2016; BRANDÃO, 2017).

Dentre os principais achados do nosso grupo de pesquisa, viu-se que o bloqueio farmacológico dos receptores NMDA pelo MK 801 diminui os escores clínicos da EAE, bem como a resposta fagocitária e a produção de citocinas inflamatórias de macrófagos e células da microglia, além de promover menor ativação e proliferação de linfócitos T (ROSSATO, 2016). Todavia, estudos mais recentes vieram a demonstrar que a atuação do MK801 se dá não apenas pelo bloqueio da fenda do receptor NMDA, como também poderia comprometer outros canais de cálcio, sendo eles o Kv1.3 e Kca3.1. (KAHLFUSS et al., 2014), o que poderia comprometer a interpretação desses resultados.

Nesse sentido, desenvolveu-se um modelo de deleção gênica com bloqueio direto da presença do receptor NMDA em linfócitos T CD4+, célula que mais teve seus números alterados nos trabalhos anteriores. Para isso, foi utilizado o sistema de cre-lox em que, por meio da expressão da enzima Cre recombinase proveniente do bacteriófago P1, há a recombinação de duas regiões de DNA flanqueadas por sítios LoxP, o que causa a inversão ou deleção dessas regiões, permitindo o nocaute ou superexpressão do gene alvo. Neste trabalho, o gene *Grin1*, responsável pela transcrição da subunidade NR1 do receptor NMDA, foi “floxeado” e a enzima Cre foi associada ao gene da molécula CD4, resultando, assim, em células T CD4+ com o gene *Grin1* deletado.

Com animais sem a expressão do receptor NMDA, buscou-se avaliar, inicialmente, qual seria a influência desta deleção na seleção tímica de animais *naïve*. Para resultados com maior acurácia, utilizou-se como controle animais que tinham o gene *Grin1* floxeado, mas não expressavam a enzima Cre, buscando, assim, a eliminação de uma possível interferência que os sítios LoxP pudessem causar.

Primeiramente, foi identificado um aumento nas células simples positivas nos timos dos camundongos C57BL/6-CD4^{CRE}/*Grin*^{Flox}, denominados CD4+ NMDA KO. Esse fenômeno pode ser resultante de dois processos diferentes: 1) aumento da viabilidade celular ou 2) menor emigração tímica (PALMER, 2003).

Nos experimentos subsequentes, observou-se diminuição da viabilidade celular nos animais controle em relação aos CD4+ NMDA KO quando estimulados com anti-CD3. Os receptores NMDA nos timócitos em processo de amadurecimento têm a função de manter a entrada de íons de cálcio na célula durante a sinapse imunológica. Após ocorrer a liberação de íons de cálcio de vesículas intracelulares e o influxo pelo canal de cálcio ativado por depleção (CRAC), mantém-se um *plateau* que dispara respostas celulares às altas concentrações do íon, que, durante o processo de maturação, estão relacionadas com a morte celular (PAPADIA, S., HARDINGHAM, G. E., 2007, AFFATICATI et al., 2011).

Já foi relatado em experimentos com camundongos quiméricos, que apresentavam a molécula MHC somente em TECs, e não em APCs, uma seleção negativa deficiente, com aumento do número de células simples positivas, corroborando o fato de que uma falha no processo de reconhecimento e eliminação das células com alta afinidade pelo complexo MHC-peptídeo próprio pode resultar em um aumento das células simples positivas (PALMER, 2003).

Verificou-se que a alteração da viabilidade nos animais CD4+ NMDA KO estava associada à morte por necrose, contudo, este tipo de morte não é muito relatado na seleção negativa. Vale ressaltar, no entanto, que o iodeto de propídio (IP) é um marcador de perda

de integridade de membrana e, apesar da sua marcação ser geralmente usada para indicar morte por necrose, ela também pode ser relacionada com o processo de apoptose tardia, em que também há desintegração da membrana (QUAGLINO; RONCHETTI, 2001). Outro mecanismo a ser considerado são aqueles decorrentes da disfunção mitocondrial, os quais podem ter sinalizado para a ruptura da membrana celular a partir do desbalanço energético celular (QUAGLINO; RONCHETTI, 2001).

Na sequência, analisou-se os órgãos linfoides secundários a fim de avaliar se a emigração tímica estaria comprometida. Inicialmente, observou-se que camundongos de aproximadamente 6 semanas apresentavam um maior número de linfócitos T no baço e linfonodos e que não havia diferença de linfócitos que expressavam a molécula CD31, característica de linfócitos recém emigrados do timo (resultado não apresentado) (HANDEL; IRANI; HOLLÄNDER, 2018). Em conjunto com os dados anteriores, esses resultados apontam para um maior processo de escape da seleção tímica.

No entanto, ao avaliar os camundongos algumas semanas mais velhos, percebeu-se que animais de 10 semanas haviam normalizado o número de linfócitos, não possuindo mais diferença em relação aos animais controles. Tal resultado pode ser decorrente de mudanças na resposta hormonal, a qual já é descrita como moduladora da resposta tímica (TAKABA; TAKAYANAGI, 2017) e envolvida com o desenvolvimento da esclerose múltipla (YSRRAELIT; CORREALE, 2019).

Uma vez que o bloqueio da sinalização do receptor NMDA já tinha sido associado com menor atividade dos linfócitos T, bem como menor severidade no modelo de EAE (ROSSATO, 2016), o próximo passo deste trabalho foi avaliar o impacto dessa diferença de idade no desenvolvimento da EAE em camundongos CD4+ NMDA KO. Assim, a indução da EAE foi feita em dois grupos de animais além dos controles, buscando possíveis diferenças nas populações celulares e produção de citocinas.

Nota-se que camundongos de 6 semanas alcançaram o mesmo escore clínico dos animais controle, porém com recuperação mais rápida, enquanto os de 10 semanas tiveram escores menores a todos os momentos da evolução clínica. É possível que essa alteração ocorra pela diferença na quantidade de linfócitos na periferia, já que a ativação e migração dessas células para o CNS é essencial para o desenvolvimento da doença (LEGROUX; ARBOUR, 2016). Assim, o aumento de células T dos camundongos mais novos pode ter compensado a menor ativação do glutamato por ausência do receptor NMDA, levando a uma doença mais grave do que animais de 10 semanas.

Com a histologia das medulas espinais e análises por citometria de fluxo, viu-se que camundongos CD4+ NMDA KO têm um menor infiltrado linfocitário. No entanto, nos animais

de 6 semanas essas células foram mais reativas para MOG do que nos de 10 semanas, o que também pode ter contribuído para que sua resposta clínica fosse maior.

Outro ponto é a menor ativação de APCs no SNC dos animais de 10 semanas, que apresentam maior número de células, mas menos sinais de ativação, como a expressão de MHC II e do correceptor CD86. Esse resultado é possivelmente decorrente de uma menor capacidade de liberação de citocinas pró-inflamatórias destes (ROSSATO, 2016).

Sabe-se que, sem a sinalização do receptor de NMDA, os linfócitos T periféricos produzem menos citocinas devido ao bloqueio da via celular das MAP quinases (BOLDYREV; BRYUSHKOVA; VLADYCHENSKAYA, 2012). Em 2014, Kahlfuss et al. demonstrou como antagonistas de NMDA diminuem a secreção de IL-2 e IFN- γ de células T de perfil Th1, mas aumentam citocinas dos linfócitos de perfil Th2, como IL-10 e IL-13.

A IL-6 ajuda na diferenciação de linfócitos T para o perfil Th17 (YANG et al., 2009), importante no desenvolvimento da EAE, no entanto, mesmo com tendência de aumento de sua expressão nos animais CD4+ NMDA KO, este efeito não se reflete na produção de IL-17, sugerindo que a sinalização pode estar comprometida pelas vias intrínsecas dos linfócitos. Além disso, o IFN- γ pode atuar de forma protetora na EAE (YANG et al., 2009), e sua diminuição foi menos relevante se comparada às outras citocinas, sendo possível que a sua função tenha sido preservada.

Em 2019, Salingrama et al. demonstraram que os linfócitos T CD4+ com especificidade para o antígeno MOG possuem um papel mais patogênico na doença, enquanto os linfócitos CD8+ exercem um papel regulador, principalmente por eliminar os clones autorreativos pelo uso de perforina e granzima (SALIGRAMA, N. et al., 2019). Neste trabalho, os animais CD4+ NMDA KO de 10 semanas apresentaram maior quantidade de células CD8+ no SNC, porém com menor expressão de V β 11, indo de acordo com o papel regulador proposto, já que sua doença foi mais branda.

Os linfócitos T reguladores (Treg) são produzidos durante o processo de tolerância central e se mostram essenciais para o controle da reação imune na periferia, limitando a ação de células T efectoras e citotóxicas, assim como das *natural killers* e macrófagos, evitando a exacerbação da inflamação (LEGROUX; ARBOUR, 2016). Na EAE, as células Treg se encontram com níveis aumentados na fase de recuperação da doença, o que leva à sua resolução espontânea, fato que não ocorre, por exemplo, em camundongos timectomizados (HANDEL; IRANI; HOLLÄNDER, 2018). As Treg são capazes de diminuir a ação de linfócitos T efetores ao inibir seu contato com APCs, além de inibir sua polarização para um perfil inflamatório (KOUTROLOS et al., 2014).

As Tregs são principalmente identificadas pela presença do FoxP3, um fator de transcrição necessário para que exerçam sua função supressora do sistema imune (DALEY, S. R. et al, 2017). Em animais CD4⁺ NMDA KO, elas estão em menor número na periferia, e com 6 semanas há uma diminuição mais expressiva na proporção dessas células, além da expressão de FoxP3, podendo ser mais um motivo para a doença nesses camundongos alcançar escores clínicos parecidos com os do grupo controle.

Essa diminuição nas células reguladoras pode ser atribuída à menor sinalização tímica durante a seleção negativa, já que a diferenciação para uma célula Treg ocorre quando, após ter passado pela seleção positiva, a célula recebe uma sinalização de forte ligação do TCR $\alpha\beta$ com o MHC e peptídeo próprio, mas, ao invés de sofrer apoptose, sofre a *upregulation* do gene FoxP3 e se diferencia para Treg (DALEY, S. R. et al, 2017). Apenas algumas células passam por essa diferenciação, porém, sem a sinalização do receptor NMDA, essa quantidade reduz ainda mais.

Uma diminuição no número de Tregs também pode ser observado em camundongos KO para o gene AIRE (HENDEL, A. 2018), nesse caso, devido à diminuição de expressão de TRAs, o que prejudica a identificação de linfócitos T CD4⁺ autorreativos. Nas duas situações, uma desregulação no processo de seleção negativa, responsável por direcionar alguns linfócitos para a linhagem de linfócitos reguladores naturais, altera o número normal de células esperadas em cada subpopulação.

Assim, esses resultados mostram como o receptor NMDA tem um papel no desenvolvimento da EAE, com os resultados anteriores do grupo sendo corroborados pelos deste trabalho, mas mostrando, também, uma influência da idade dos camundongos nas populações de linfócitos que não havia sido detectada anteriormente.

6.0 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a ausência do receptor NMDA em linfócitos T leva a uma alteração na seleção tímica, com aumento de células simples positivas e maior viabilidade celular perante ao estímulo com anti-CD3. Esta alteração parece estar relacionada com aumento do número de células T nos órgãos periféricos, incluindo clones autorreativos que se normalizam no período de 10 semanas. Por fim, o bloqueio da sinalização do receptor NMDA diminui o infiltrado leucocitário em animais com EAE com diferenças nas subpopulações de linfócitos e na clínica da doença dependendo de qual idade do animal.

7.0 BIBLIOGRAFIA

1. ATLAS OF MS 2013, MAPPING MULTIPLE SCLEROSIS AROUND THE WORLD. Multiple Sclerosis International Federation 2013. Retirado de <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf> acesso em 18 de julho de 2020.
 2. “RECOMENDAÇÕES ESCLEROSE MÚLTIPLA”. Academia Brasileira de Neurologia, 2012. Retirado de http://formsus.datasus.gov.br/novoimgargq/14491/2240628_109700.pdf acesso em 18 de julho de 2020.
- ABBAS, A. K.; LICHTMANN, H. ANDREW; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio De Janeiro: **Elsevier**, 2008. 564 p.
- AFFATICATI P. et al. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 1, p. 99–108, 2011.
- ALTIN, J. G.; SLOAN, E. K. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. **Immunology and Cell Biology**, v. 75, n. 5, p. 430–445, 1997.
- ANDERSSON U, TRACEY KJ. Neural reflexes in inflammation and immunity. **J Exp Med** 209:1057–68, 2012.
- BAECHER-ALLAN, C.; KASKOW, B. J.; WEINER, H. L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. **Neuron**, v. 97, n. 4, p. 742–768, 2018.
- BITTNER, S. et al. Myelin Oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 86, p. 3–7, 2014
- BOLDYREV, A. A. et al. Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 1, p. 133–139, 2004.
- BOLDYREV, A. A.; BRYUSHKOVA, E. A.; VLADYCHENSKAYA, E. A. NMDA receptors in immune competent cells. **Biochemistry (Moscow)**, v. 77, n. 2, p. 128–134, 2012.
- BRANDÃO, Wesley Nogueira. Glutamato através da sinalização pelo NMDAR modula a resposta inata de células imunitárias in vitro durante hipóxia. 2017. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.42.2018.tde-05022018-171917. Acesso em: 2020-10-28.
- CONFAVREUX, C. et al. Relapses and Progression of Disability in Multiple Sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1253–1260, 2000.
- COX, G. M. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Potentiates Autoimmune-Mediated Neuroinflammation. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 3, p. 1043–1054, 2013.
- CROXFORD, J. L. et al. Structural requirements for initiation of cross-reactivity and CNS autoimmunity with a PLP139-151 mimic peptide derived from murine hepatitis virus. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 10, p. 2671–2680, 2006.
- DALEY, S. R. et al. Cell death and thymic tolerance. **Immunological Reviews**, v. 277, n. 1, p. 9–20, 2017.
- DYMENT, D. A.; EBERS, G. C.; SADOVNICK, A. D. Review Genetics of multiple sclerosis. **Lancet**, v. 3, n. February, p. 104–110, 2004.
- ERKENSTAM, N. H. et al. Temporal characterization of microglia/macrophage phenotypes in a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. DEC2016, 2016.
- FAN, X.; JIN, W. Y.; WANG, Y. T. The NMDA receptor complex: A multifunctional machine at the glutamatergic synapse. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. JUN, p. 1–9,

2014.

FILIPPI, M. et al. Multiple sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–27, 2018.

FLIPPE, L. et al. Future prospects for CD8+ regulatory T cells in immune tolerance. **Immunological Reviews**, v. 292, n. 1, p. 209–224, 2019.

FROHMAN, E. M.; RACKE, M. K.; RAINE, C. S. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 9, p. 942–955, 2006.

GOLD, R. et al. Evolving expectations around early management of multiple sclerosis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 3, n. 6, p. 351–367, 2010.

HANDEL, A. E.; IRANI, S. R.; HOLLÄNDER, G. A. The role of thymic tolerance in CNS autoimmune disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 12, p. 723–734, 2018.

HIKOSAKA, Y. et al. The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 438–450, 2008.

HOWARD, J.; TREVICK, S.; YOUNGER, D. S. Epidemiology of Multiple Sclerosis. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 919–939, 2016.

INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSORTIUM. A High-Density Screen for Linkage in Multiple Sclerosis. **The American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 3, p. 454–467, 2005.

JUNIOR, C. A. J.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença*. 6. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2007. 824 p.

KAHLFUSS, S. et al. Immunosuppression by N -Methyl-d-Aspartate Receptor Antagonists Is Mediated through Inhibition of K v 1.3 and K Ca 3.1 Channels in T Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 34, n. 5, p. 820–831, 2014.

KOUTROLOS, M. et al. Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2014.

LASSMANN, H. Multiple sclerosis pathology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 3, p. 1–16, 2018.

LASSMANN, H.; BRADL, M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 223–244, 2017.

LASSMANN, H.; BRÜCK, W.; LUCCHINETTI, C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: Implications for diagnosis and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 115–121, 2001.

LEGROUX, L.; ARBOUR, N. Multiple sclerosis and t lymphocytes : an entangled story t lymphocytes : key cells of the adaptive immune responses. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 10, n. 4, p. 528–546, 2016.

LEPOSAVIC, G. et al. Early postnatal castration affects thymic and thymocyte noradrenaline levels and beta-adrenoceptor-mediated influence on the thymopoiesis in adult rats. **J Neuroimmunol.** 2007; 182(1-2):100–15.

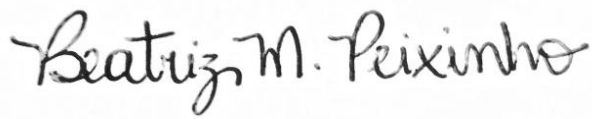
MARTIN, E. et al. Analysis of microglia and monocyte-derived macrophages from the central nervous system by flow cytometry. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 124, p. 1–7, 2017.

MITTELSTADT, P.R.; MONTEIRO, J.P.; ASWELL, J.D. Thymocyte responsiveness to endogenous glucocorticoids is required for immunological fitness. **J Clin Invest** 2012;122(7).

NA, I.K. et al. Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. **Haematologica**, 2012. 98(1), 23–30.

ORIHARA, K. et al. Neurotransmitter signalling via NMDA receptors leads to decreased T

- helper type 1-like and enhanced T helper type 2-like immune balance in humans. **Immunology**, v. 153, n. 3, p. 368–379, 2018.
- PACHECO, R. et al. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 185, n. 1–2, p. 9–19, 2007.
- PALMER, E. Negative selection - Clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 5, p. 383–391, 2003.
- PAPADIA, S.; HARDINGHAM, G. E. Europe PMC Funders Group The dichotomy of NMDA receptor signalling. **Neuroscientist**, v. 13, n. 6, p. 572–579, 2007.
- PARSONS, M. P.; RAYMOND, L. A. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. **Neuron Review Cell Press**, v. 82, n. 2, p. 279–293, 2014.
- QUAGLINO, D.; RONCHETTI, I. P. Cell death in the rat thymus: A minireview. **Apoptosis**, v. 6, n. 5, p. 389–401, 2001.
- REINGOLD, S. C.; LUBLIN, F. D. Defining the clinical course of multiple sclerosis : Results of an international survey. **Neurology**, v. 46, p. 907–911, 1996.
- ROSSATO, C. Estudo do Papel do Receptor Ionotrópico de Glutamato NMDAR na Imunomodulação da Encefalomielite Experimental Autoimune. p. 0–87, 2016.
- SALIGRAMA, N. et al. Opposing T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nature**, v. 572, n. 7770, p. 481–487, 2019.
- SHAPIRO, R. The Symptomatic Management of Multiple Sclerosis. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 2, n. 3, p. 137–139, 2009.
- TAKABA, H.; TAKAYANAGI, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 11, p. 805–816, 2017.
- TOURIGNY, B. M. R. et al. T cell receptor (TCR)-beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *J Exp Med.* v. 185, n. 9, p. 1549–1556, 1997.
- VYKLICKY, V. et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. **Physiological research**, v. 63 Suppl 1, p. S191-203, 2014.
- WESTENDORF, K. et al. Chromosomal localisation of the CD4cre transgene in B6-Cg-Tg(Cd4-cre)1Cwi mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 436, p. 54–57, 2016.
- XIE, J. et al. The influences of age on T lymphocyte subsets in C57BL/6 mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 108–113, 2017.
- YANG, K. et al. Deficiency of Thrombospondin-1 Reduces Th17 Differentiation and Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of Autoimmunology**, v. 32, n. 2, p. 94–103, 2009.

A handwritten signature in black ink that reads "Beatriz M. Peixinho". The script is fluid and cursive, with the first letters of each word being capitalized and prominent.

Beatriz Mayumi Peixinho

A handwritten signature in black ink that reads "W. N. Brandão". The signature is written in a cursive style, with the initials "W. N." followed by the surname "Brandão".

Wesley Nogueira Brandão



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.29.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **103/2017/CEUA**, válido até **22/11/2021**, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Jean Pierre Schatzmann Peron**, do Departamento de **Imunologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Beatriz Mayumi Peixinho** na equipe do Projeto de Pesquisa "*Atuação da sinalização do receptor ionotrópico do glutamato-NMDA sobre a ontogenia dos linfócitos T e sua repercussão no desenvolvimento da Encefalomielite Autoimune Experimental*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 25 de março de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP