

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Kawany Santos do Nascimento

Modelos animais para estudo de Esclerose Múltipla

São Paulo

2020

Kawany Santos do Nascimento

Modelos animais para estudo de Esclerose Múltipla

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Toxinas de Interesse em Saúde.

Orientadora: Gisele Picolo

São Paulo

2020

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Nascimento, Kawany Santos

Modelos animais para estudo de Esclerose Múltipla / Kawany Santos do Nascimento; orientadora Gisele Picolo. – São Paulo, 2020

32 p.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilheme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde

Assunto. I. Picolo Gisele. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno a partir do modelo desenvolvido pela
Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

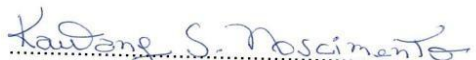
Eu, Kawany Santos do Nascimento, aluna de especialização do Programa de Especialização em Toxinas de Interesse em saúde do Cefor/SUS/SP, autorizo a divulgação de minha monografia por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação/tese após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.


Prazo de liberação da divulgação da monografia

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 30 de Janeiro de 2020


.....
Aluna: Kawany Santos do Nascimento

De acordo: 
.....
Orientadora: Gisele Picolo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, por todo o amor e compreensão.

Ao meu querido irmão Victor Hugo pelo amor incondicional.

Agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Gisele Picolo, pelo aprendizado, paciência e todo o auxílio que precisei nesse período.

Ao coordenador do curso de Toxinas do Interesse em Saúde o Dr. Luis Roberto Gonçalves, por todo o apoio e dedicação aos alunos nesse período.

Os colegas do laboratório de Dor e Sinalização – LEDS, pela ajuda na manipulação dos animais, realização de experimentos e todo o apoio e carinho.

A minha amiga Karina Giannotti que sempre esteve ao meu lado nesse período, me incentivando e torcendo por mim, muito obrigada.

Ao Instituto Butantan por toda infraestrutura e aparato necessários para realização de todos os experimentos.

Enfim a todos do laboratório de Dor e Sinalização do Instituto Butantan, onde aprendi muito e jamais esquecerei o carinho com que fui acolhida por todos.

Este trabalho teve apoio financeiro do *Centro de Formação de Recursos Humanos do SUS/SP "Dr. Antônio Guilherme de Souza"*.

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.”

Benjamin Franklin

RESUMO

NASCIMENTO, Kawany. **Modelos animais para estudo de Esclerose Múltipla**. 2020. 32 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), que atinge principalmente adultos jovens. De etiologia idiopática, acredita-se que mecanismos autoimunes, predisposição genética, histórico de infecção viral, tabagismo, hipovitaminose D, exposição reduzida a raios ultravioleta e localização geográfica são fatores associados ao desenvolvimento da doença. A principal característica da EM é a formação de lesões desmielinizadas que cria um ambiente que impede o acesso, sobrevivência e diferenciação das células precursoras de oligodendrócito (OPCs). Com o decorrer do tempo há uma falha na remielinização, especialmente em lesões crônicas. As manifestações clínicas da doença são atribuídas ao aparecimento dessas lesões durante os períodos de surto, principalmente na fase inicial da doença. Os sintomas mais comuns são: comprometimento da visão devido à inflamação do nervo óptico (neurite óptica), incapacidades relacionadas ao movimento, prejuízos cognitivos e de memória, déficit sensitivos, enfim uma série de manifestações heterogêneas, fato que dificultava o estabelecimento rápido de um diagnóstico definitivo. A doença pode ser classificada como Remitente Recorrente (EMRR), o tipo mais comum de EM, onde ocorrem surtos súbitos que duram no mínimo 24 horas chegando a dias ou semanas e, então, melhoram. A Primária Progressiva (EMPP) é o tipo onde o paciente não apresenta surtos, mas desenvolve sintomas e sequelas progressivamente por conta da doença. E por fim a Secundária-Progressiva (EMSP) se define quando o paciente apresenta inicialmente surtos e remissões e, após algum tempo, a doença se torna progressiva e o paciente piora de forma lenta, sem que obrigatoriamente tenha novos surtos. O presente trabalho tem por objetivo retratar os diferentes modelos animais para estudo da esclerose múltipla, apontando suas metodologias, utilização e reprodutibilidade. Existem diversos modelos de estudo para EM utilizando animais, que utilizam diferentes agentes indutores da doença como, por exemplo, Toxinas, Anticorpos, Cuprizona, entre outros. Um dos modelos animais que mais se assemelha à doença em humanos, gerando diversas características semelhantes à Esclerose Múltipla é o modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental, que além de apresentar excelente reprodutibilidade é um dos mais utilizados.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Encefalomielite Autoimune Experimental. Modelos Animais.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Kawany. **Animal models for the study of Multiple Sclerosis**. 2020. 32p Monograph -(Specialization in Toxins of Interest in Health)– Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS) that affects mainly young adults. Of idiopathic etiology, it is believed that autoimmune mechanisms, genetic predisposition, history of viral infection, smoking, hypovitaminosis D, reduced exposure to ultraviolet rays and geographic location are factors associated with the development of the disease. One of the main features linked to MS is the occurrence of demyelinated lesions that creates an environment that prevents access, survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs). In the course of the disease a failure in remyelination process occurs, mainly in chronic process of lesions. The clinical manifestations of the disease are attributed to the appearance of these lesions during periods of an outbreak, especially in the initial phase of the disease. The most common symptoms are: impaired vision due to inflammation of the optic nerve (optic neuritis), disabilities related to movement, cognitive and memory impairments, sensory deficits and a serie of heterogeneous manifestations, fact that hindered the rapid establishment of a definitive diagnosis. The disease can be classified as Recurrent Remitting (EMRR), the most common type of MS, where it can be observed the occurrence of sudden outbreaks that last at least 24 hours reaching days or weeks and regressing thereafter. In the Progressive Primary (EMPP) type, the patient does not have outbreaks, but progressively develops symptoms and sequels due to the disease. And finally the Secondary-Progressive (EMSP), which is defined when the patient initially presents outbreaks and remissions and, after some time, the disease becomes progressive and the patient worsens slowly, without necessarily having new outbreaks. This work aims to describe different animal models for the study of multiple sclerosis, pointing out their methodologies, use and reproducibility. There are several animal models for MS study, using different compounds as inducers, such as toxins, antibodies, cuprizone, among others. One of the animal models that most resemble characteristics of the Multiple Sclerosis in humans is the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis model, which besides to have excellent reproducibility is one of the most used model.

Keywords: Multiple Sclerosis. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Animal Models.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 Geral..... | 14 |
| 2.2 Específicos..... | 14 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 15 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 16 |
| 4.1 Modelo de desmielinização induzido por toxinas | 16 |
| 4.2 Lisolectina | 16 |
| 4.3 Cuprizona..... | 18 |
| 4.4 Outras Toxinas..... | 20 |
| 4.5 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) | 21 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 23 |
| REFERÊNCIAS..... | 24 |
| APÊNDICE..... | 29 |

1 INTRODUÇÃO

Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neuroinflamatória crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), de origem autoimune, caracterizada por episódios repetidos de disfunção neurológica com remissão variável (MOREIRA *et al*, 2000) caracterizada pelo acúmulo de incapacidade motora. Acredita-se ser uma doença autoimune mediada preferencialmente por células T. No entanto, a etiologia da EM ainda não é clara, embora muitos fatores ambientais e a interação entre múltiplos genes tenham sido propostos para explicar a ocorrência da doença (BJELOBABA *et al*, 2018), caracterizada pela produção de auto-anticorpos contra os componentes da bainha de mielina. Geralmente acomete indivíduos adultos jovens (20 a 30 anos), sendo 2 vezes mais frequentes em mulheres. Estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo (FOX *et al*, 2006). A EM caracteriza-se pelo aparecimento de lesões dispersas na substância branca do SNC, visualizadas em exame de imagem de ressonância magnética. Além da destruição da mielina, ocorrem também danos aos axônios dos neurônios e presença de cicatrizes gliais, juntamente com presença de um infiltrado inflamatório composto principalmente de linfócitos e macrófagos (PEDROSA *et al*, 2010). As manifestações clínicas da doença são atribuídas ao aparecimento dessas lesões durante os períodos de surto, principalmente na fase inicial da doença. Os sintomas mais comuns são: comprometimento da visão devido à inflamação do nervo óptico (neurite óptica), incapacidades relacionadas ao movimento, prejuízos cognitivos e de memória, déficit sensitivos, entre outros, representando uma série de manifestações heterogêneas, fato que dificulta o estabelecimento rápido de um diagnóstico definitivo (PEDROSA *et al*, 2010). São reconhecidos três cursos da doença: Esclerose Múltipla Remitente Recorrente, Esclerose Múltipla primária progressiva e Esclerose Múltipla secundária progressiva. O curso remitente recorrente afeta inicialmente a maioria dos pacientes com EM; geralmente é seguido por um curso secundário progressivo da doença, caracterizado por um acúmulo de déficits neurológicos (LASSMANN *et al.*, 2012).

As lesões da EM são resultantes de uma cascata inflamatória central posterior à resposta periférica. O aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica é resultante do recrutamento de infiltrados inflamatórios perivasculares de linfócitos T

e B e macrófagos, bem como da liberação de citocinas pró-inflamatórias. A principal característica destas lesões é a desmielinização focal da substância branca, inicialmente com preservação de axônios e com variados graus de gliose (ZURAWSKI e STANKIEWICZ, 2018), com presença de infiltrado inflamatório de linfócitos T e B, plasmócitos e macrófagos. Entretanto, nem sempre há formação do infiltrado inflamatório, o que sugere ação de células endógenas como astrócitos e micróglia (AHMED *et al*, 2013). O processo inflamatório e a desmielinização podem ocorrer em qualquer região do parênquima encefálico, sendo os relatos diagnósticos mais comuns o nervo óptico, a área quiasmática, a zona periventricular da substância branca, a área cortical subpial, o tronco encefálico e a medula espinal cervical (DUNCAN, FRANKLIN, 2013). A degeneração do corpo caloso é proeminente na EM (YALDIZLI *et al.*, 2014).

A doença é caracterizada por ataques do sistema imunológico à bainha de mielina, seguidos por períodos de remissão. Nos períodos de surto, novas lesões podem surgir, assim como a reativação de lesões antigas. Com o passar do tempo e a persistência das lesões, a doença entra em uma fase de progressão ininterrupta, chamada então de secundária progressiva. Aproximadamente entre 10-20% dos casos de EM exibem um quadro de evolução contínua, sem remissões, denominada primária progressiva (LASSMANN *et al.*, 2012).

Dois situações clínicas distintas são observadas em pacientes com EM primeiro os ataques clínicos agudos, também chamados de recaída, e o segundo a progressão contínua da incapacidade clínica. Durante uma recaída, os pacientes experimentam a rápida ocorrência de sintomas neurológicos novos ou crescentes. Esses ataques também chamados de exacerbações são seguidos por períodos de recuperação parcial ou mesmo completa (remissões). Por definição, não há progressão aparente da doença entre duas recaídas, o que implica que o nível de incapacidade entre dois ataques permanece estável. Essa fase do curso da doença é denominada EM Remitente Recorrente (EMRR) e afeta inicialmente 85% dos pacientes diagnosticados com EM (BRAIN PATHOLOGY, 2017).

A EM é uma doença que não possui cura, sendo a principal abordagem terapêutica focada em compostos que atrasem o progresso da doença e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes pela promoção do alívio dos sintomas. As terapias atualmente aprovadas são drogas imunomoduladoras ou imunossupressoras que reduzem, de forma significativa, entretanto variável, a frequência dos episódios das formas recorrentes da doença. Estes compostos, de forma geral, possuem eficácia limitada na prevenção da transição das fases da doença e, uma vez iniciado este processo, não apresentam benefícios (GAJOFATTO *et al*/2015).

Com relação a tudo que se sabe sobre a Esclerose Múltipla, muitos estudos ainda são realizados visto que é uma doença sem cura e não totalmente elucidada.

Vários modelos animais são utilizados para induzir sintomas e comportamentos que se assemelham à patologia da EM em humanos; entre os mais empregados estão o modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e a desmielinização induzida por toxinas e / ou vírus. Embora os modelos animais não possam replicar a complexidade e a heterogeneidade da patologia da EM eles provaram ser úteis para o desenvolvimento de vários medicamentos aprovados para o tratamento de pacientes com EM (IVANA BJELOBABA *et al*, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo dessa Monografia é a pesquisa dos diferentes modelos animais para estudo da Esclerose Múltipla.

2.2 Específicos

- Discutir os diversos métodos existentes para o estudo da Esclerose Múltipla em modelo animal.
- Demonstração das metodologias estudadas no período da Especialização.
- Experimento com relação a Dor em camundongos C57BL/6.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O tema escolhido para essa monografia foi decorrente do estudo que pude acompanhar durante o estágio no Laboratório de Dor e Sinalização do Instituto Butantan utilizando o modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental induzido por MOG₃₅₋₅₅, e o propósito deste trabalho é descrever e atualizar os diferentes modelos animais existentes.

Foi realizado levantamento bibliográfico nas fontes de pesquisa online PubMed, Scielo.org, Google Acadêmico, totalizando 49 consultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem diversos modelos animais que reproduzem a Esclerose Múltipla em modelos animais, alguns com maior reprodutibilidade do que outros. Vamos discutir aqui alguns dos modelos mais utilizados nestes estudos.

4.1 Modelo de desmielinização induzido por toxinas

Sabe-se que existem diversos agentes que geram focos de desmielinização, usando injeções diretas de gliotoxinas na substância branca, como brometo de etídio (EtBr) e lisolecitina, ou toxinas administradas sistemicamente, como a cuprizona (WOODRUFF & FRANKLIN, 1999). Esses modelos são indispensáveis no estudo dos processos de remielinização em animais de estudo. Além desses modelos garantirem uma boa reprodutibilidade, a localização anatômica da área de desmielinização é bem definida.

Ionóforo de cálcio, anticorpos contra galactocerebrosideo, 6-aminonicotinamida e toxina da difteria também podem ser usados como agentes desmielinizantes; no entanto, essas abordagens não são consideradas modelos adequados para obter novos conhecimentos sobre os processos de remielinização. Outra desvantagem desses modelos está na ausência da atividade imune (IVANA BJELOBABA *et al*, 2018)

4.2 Lisolecitina

A lisolecitina foi descrita pela primeira vez por Hall (1972). Tendo conhecida atividade detergente, a lisolecitina é capaz de solubilizar as membranas, sendo considerada seletiva para as células produtoras de mielina, acarretando desmielinização.

Com isso a lisolecitina mostra ser um método útil para o estudo tanto da desmielinização, quanto da remielinização do sistema nervoso central. A desvantagem desse modelo está na ausência da resposta imune que é normalmente observada durante a Esclerose Múltipla.

A injeção de lisolecitina aumenta a atividade da fosfolipase A2, restrita aos macrófagos ativados (TROTTER & SMITH, 1986). A fosfolipase A2 degrada ainda mais as fosfatidilcolinas da membrana (WELTZIEN, 1979). Geralmente, a solução de

lisolecitina a 1% é injetada no funículo dorsal da medula espinhal, no pedúnculo cerebelar caudal (WOODRUFF & FRANKLIN, 1999) ou no corpo caloso (KEOUGH, JENSEN & YONG, 2015). Após a injeção de lisolecitina, a lesão formada tem uma modificação nas próximas semanas e é capaz de remielinizar completamente, começando no final da primeira semana após a injeção (BLAKEMORE & FRANKLIN, 2008). O processo de remielinização neste modelo é mais rápido em comparação com outros modelos de desmielinização induzida por toxinas, principalmente porque as células progenitoras dos oligodendrócitos (OPCs) não são afetadas (BLAKEMORE & FRANKLIN, 2008). Os axônios desmielinizantes são remielinizados principalmente por oligodendrócitos. No entanto, se a lesão for maior, as células de Schwann também participam do processo de remielinização. Como no modelo de brometo de etídio (EtBr), a remielinização ocorre mais rapidamente em animais jovens de diferentes espécies (SHIELDS, GILSON, BLAKEMORE e FRANKLIN, 1999). A remielinização começa apenas após a remoção dos detritos de mielina - ou seja, cerca de 7 dias após a injeção de lisolecitina na medula espinhal de camundongos ou ratos adultos jovens, quando bainhas de mielina pálidas começam a aparecer. Quando a injeção de lisolecitina é aplicada no pedúnculo cerebelar caudal, a remielinização é bastante lenta em comparação com a injeção da medula espinhal. Nestes casos, a remielinização começa 3 semanas após a injeção, e a mielina compacta aparece 6 semanas após a desmielinização (WOODRUFF & FRANKLIN, 1999). O tratamento com lisolecitina, em contraste com o EtBr, não induz uma perda de astrócitos, OPCs ou macrófagos, facilitando a remielinização mais rápida. O padrão recorrente de desmielinização primária que pode ser controlado de maneira espaço-temporal é uma vantagem desse modelo de desmielinização. A desmielinização induzida por lisolecitina também pode ser realizada em primatas não humanos. Os processos de desmielinização / remielinização foram avaliados em *Macaca fascicularis* adultas após injeção de lisolecitina no nervo óptico ou medula espinhal. A remielinização ocorre na medula espinhal, enquanto falha no nervo óptico (LACHAPPELLE *et al.*, 2005).

Portanto, a lisolecitina mostra-se um método útil para estudar tanto a desmielinização quanto a remielinização no SNC. A desvantagem do modelo de desmielinização da lisolecitina reside na ausência da resposta imune que é normalmente observada durante a EM.

4.3 Cuprizona

Cuprizona é um agente quelante de cobre e tóxico para a camada de mielina. O modelo de desmielinização de cuprizona é um modelo simples, usado para investigar respostas inflamatórias intrínsecas do cérebro, juntamente com os processos de desmielinização / remielinização. As lesões provocadas pela cuprizona estão relacionadas a disfunção dos oligodendrócitos. Esse modelo foi considerado um modelo típico de desmielinização da substância branca; no entanto, estudos recentes confirmam que a substância cinzenta também é afetada (GOLDBERG, CLARNER, BEYER & KIPP, 2015; KHODANOVICH *et al.*, 2017).

Desde 1972, tem sido relatado que a cuprizona é um modelo adequado para o estudo de eventos de desmielinização durante a EM, pois fornece um sistema altamente reprodutível para explorar a apoptose de oligodendrócitos e a desmielinização secundária (MATSUSHIMA & MORELL, 2001). Este composto é amplamente utilizado em camundongos C57BL / 6, uma vez que seu uso nestes animais produz um modelo altamente reprodutível de investigação de desmielinização / remielinização (PRAET *et al.*, 2014). Neste modelo, a apoptose dos oligodendrócitos ocorre 3 dias após a exposição à cuprizona (HESSE *et al.*, 2010; MASON *et al.*, 2004) e a desmielinização 5 dias após.

A desmielinização é geralmente evidente três semanas após o início da administração da cuprizona e se correlaciona com imensa microgliose, astrogliose e danos no axônio (DOAN *et al.*, 2013 ; KIPP *et al.*, 2017) Seis semanas após a ingestão de cuprizona, a desmielinização é generalizada, mas é mais proeminente no corpo caloso e nos pedúnculos cerebelares posteriores e é denominada "desmielinização aguda". Perda de mielina também é observada no córtex, hipocampo e cerebelo (BAXI *et al.*, 2017; KIPP, CLARNER, DANG, COPRAY, & BEYER, 2009).

A intoxicação por cuprizona induz um grau variável de desmielinização que depende da tensão, idade e sexo dos animais, bem como da duração da exposição e dosagem deste agente tóxico. De fato, foi relatado que, quando expostos à cuprizona, camundongos suíços, camundongos BALB / c e suíços Jim Lambert (SJL) apresentam desmielinização, porém tardia ou incompleta (SKRIPULETZ *et al.*, 2008; TAYLOR, GILMORE; MATSUSHIMA, 2009).

A desmielinização aguda é seguida por remielinização espontânea, quando uma dieta com cuprizona é substituída pela alimentação regular. O processo de remielinização depende da maturação do OPC, e o reaparecimento da mielina na substância branca é mais óbvio do que na substância cinzenta, onde a proliferação e diferenciação do OPC é prolongada na desmielinização induzida pela cuprizona (BAXI *et al.*, 2017). Pelo contrário, a intoxicação prolongada por cuprizona (mais de 12 semanas) resulta em um processo de remielinização espontânea restrita: "desmielinização crônica". Durante os estágios crônicos da doença, a apoptose de oligodendrócitos ocorre de maneira independente da caspase-3 (GUDI, GINGELE, SKRIPULETZ, & STANGEL, 2014). A aplicação sistêmica da cuprizona gera desmielinização no corpo caloso; no entanto, uma perda de mielina também é observada no córtex, hipocampo e cerebelo (BAXI *et al.*, 2017; KIPP, CLARNER, DANG, COPRAY, & BEYER, 2009).

As consequências da desmielinização induzida pela cuprizona nos déficits funcionais de maneira comportamental e cognitiva não foram avaliadas de forma abrangente. Até o momento, a coordenação motora diminuída de camundongos no teste do Rotarod, comportamento social prejudicado e função sensório-motora, bem como a ansiedade reduzida, foram descritos, embora alguns desses déficits não foram observados após remielinização (FRANCO - PONS, TORRENTE, COLOMINA & VILELLA, 2007 ; HIBBITS, PANNU, WU & ARMSTRONG, 2009).

Recentemente, a cuprizona foi usada em combinação com EAE induzida ativamente, resultando em lesões inflamatórias do cérebro anterior (RUTHER *et al.*, 2017; SCHELD *et al.*, 2016). Portanto, este modelo pode ser uma ferramenta extremamente valiosa na pesquisa da EM no futuro.

Resumidamente a simplicidade do modelo, juntamente com alta confiabilidade e reprodutibilidade o tornam ideal para induzir e examinar processos de desmielinização / remielinização (MATSUSHIMA & MORELL, 2001). Como em outras desmielinizações induzidas por toxinas, a desvantagem desse modelo é a falta de envolvimento do sistema imunológico, que é um componente importante da patogênese da EM.

4.4 Outras Toxinas

Existem outras toxinas capazes de induzir desmielinização, porém não são tão comumente utilizadas como as descritas acima, como a injeção do ionóforo de cálcio, ou onomicina, por exemplo. Estas toxinas injetadas intratecal na coluna dorsal da medula espinhal induz a vesiculação da mielina que progride e forma grandes focos de desmielinização confluentes, levando à degeneração do axônio de maneira dependente da dose (SMITH & HALL, 1988, 1994). Esse tipo de lesão criada pela injeção de ionomicina se assemelha à lesão observada no modelo de desmielinização da lisolecitina (SMITH & HALL, 1988). Um antimetabólito de niacina e uma conhecida gliotoxina, 6-aminonicotinamida, são também usados para induzir a degeneração glial, especialmente na substância cinzenta de ratos adultos (HORITA, ISHII & ZUMIYAMA, 1981; SCHNEIDER & CERVOS-NAVARRO, 1974).

A administração de 6-aminonicotinamida na medula espinhal de ratos induz a formação de focos de desmielinização, enquanto os astrócitos e oligodendrócitos sofrem degeneração. No entanto, devido ao extenso dano axonal, essa abordagem não é considerada um sistema modelo adequado para o estudo das relações celulares durante a remielinização (BLAKEMORE, 1978). Nos gatos, a injeção de 6-aminonicotinamida na medula espinhal causa a morte maciça de axônios e células da glia. Os axônios desmielinizados sobreviventes são remielinizados pelas células de Schwann. No entanto, devido ao extenso dano axonal, essa abordagem não é considerada um modelo adequado para o estudo das relações celulares durante a remielinização (BLAKEMORE, 1978).

Foi postulado que a toxina da difteria poderia produzir um modelo útil para o estudo da desmielinização central (HARRISON, MCDONALD & OCHOA, 1972). Após a exposição à toxina da difteria, os axônios adjacentes ao local da injeção apresentam camadas de mielina extremamente finas, que é a principal característica deste modelo. Mais tarde, foi observado que uma pequena dose de toxina da difteria induz desmielinização periférica com a presença de degeneração axonal (BABA, GILLIATT, HARDING & REINERS, 1984). Foi mostrado o uso da toxina da difteria para depleção celular, onde a morte de oligodendrócitos anatomicamente direcionada também pode ser induzida por recombinação em camundongos transgênicos portadores de uma toxina da difteria floxada (fragmento A)

(BROCKSCHNIEDER *et al.*, 2004; BROCKSCHNIEDER, PECHMANN, SONNENBERG - RIETHMACHER E RIETHMACHER, 2006).

4.5 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

A EAE é um dos modelos animais mais estudados da Esclerose Múltipla que acarreta diversas características histopatológicas e imunológicas da Esclerose Múltipla observadas em humanos. Existem diferentes tipos de encefalomielite autoimune experimental, cada um exibindo alguns aspectos da Esclerose Múltipla.

O modelo de EAE é um dos amplamente empregados caracterizando-se por uma reação autoimune contra as proteínas da mielina no sistema nervoso central. O modelo de EAE induzido por MOG35-55 (glicoproteína oligodendrocitária da mielina, MOG) (MCCATHY, DP, *et al* 2012), desencadeia uma resposta mediada por células Th1 e Th17 oriundas de células T CD4+ e linfócitos T CD8+, sendo os linfócitos CD4+ os principais mediadores do processo. Essas células, após entrarem no sistema nervoso central, visam proteínas de mielina e oligodendrócitos maduros causando degradação de mielina, danos axonais e apoptose de oligodendrócitos. (PATEL, J; BALABANOV, R. 2012). A migração de células T para o cérebro é tipicamente acompanhada pela infiltração e ativação de monócitos e/ou macrófagos. Além disso, a microglia residente e os astrócitos respondem ativamente à injúria e também são ativados. Todos esses tipos celulares produzem e liberam mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas, que contribuem para o dano axonal e desmielinização (YAMASAKI, R; *et al.*2014)

A EAE é um modelo útil para o estudo de EM, tanto para entendimento da doença como para o teste de compostos terapêuticos. Geralmente, com exceção de camundongos transgênicos que podem desenvolver espontaneamente a doença, todas as cepas de animais usadas nos modelos de EAE precisam ser imunizadas com auto-antígeno para desenvolver a doença (CROXFORD, KURSCHUS & WAISMAN, 2011). Como consequência, dependendo da linhagem, idade e sexo do animal, é adquirida uma doença autoimune, desmielinizante, inflamatória aguda e / ou crônica. A EAE pode ser induzida por duas abordagens diferentes: imunização ativa com peptídeos de mielina ou células T encefalitogênicas transferidas passivamente ou adotivamente (STROMNES & GOVERMAN, 2006a, 2006b).

Usando o EAE, é possível investigar os mecanismos operantes durante a preparação das células T, como as células T encefalitogênicas e outras células imunes periféricas atravessam a barreira hematoencefálica, os tipos de células envolvidas na orquestração da reativação local das células T no parênquima cerebral e como a inflamação, desmielinização e patologia axonal estão relacionadas entre si (MARKUS KIPP, STELLA NYAMOYA *et al* 2016). Ainda, diferentes tipos de EAE podem ser desenvolvidos em diferentes linhagens animais.

Até os dias atuais a EAE é o único modelo que pode reproduzir alguns aspectos da Esclerose Múltipla, com base nisso outros novos modelos estão em desenvolvimento usando a EAE como base. Com a expansão das modificações genéticas em roedores, tornou-se possível gerar vários animais transgênicos que são utilizados para avaliar a contribuição de genes específicos para o desenvolvimento e resolução de EAE. Vários nocautes e, com o desenvolvimento da tecnologia Cre-lox, camundongos nocautes condicionais foram usados na pesquisa da EAE. Como os camundongos C57BL / 6J são o pano de fundo preferido para manipulações genéticas, isso promoveu o desenvolvimento do modelo EAE nessa cepa (IVANA BJELOBABA *et al* 2018)

5 CONCLUSÕES

Com base na revisão bibliográfica realizada nesse trabalho, e a vivência no nosso laboratório podemos concluir que existem diversos modelos animais para tentar reproduzir as características da doença Esclerose Múltipla.

Importante enfatizar que não existe o modelo animal perfeito para a Esclerose Múltipla, uma vez que essa doença é um distúrbio totalmente humano.

Os processos patológicos na EM são múltiplos e heterogêneos e, portanto, modelos animais aplicados nos permitem estudar aspectos diferentes e muito distintos da doença, em vez de toda a sua complexidade. Um dos modelos animais de EM aplicados com mais frequência é o EAE, e dos vários protocolos de EAE, a doença induzida por MOG35-55 em camundongos C57BL6 é em muitos laboratórios o primeiro método de escolha.

Em seguida, considerando a limitação de todos os modelos de comportamento usados para reproduzir patologias humanas, selecionamos aquele usado com frequência e aceitável para estudos de EM (BRAIN PATHOLOGY, 2017).

REFERÊNCIAS¹

ANDREW, L. *et al.* Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 2, p.177-183, 2011.

ARNOLD, Bernd; REUTHER, Regina; WELTZIEN, Hans Ulrich. Distribution and metabolism of synthetic alkyl analogs of lysophosphatidylcholine in mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 530, n. 1, p. 47-55, 1978.

BAXI, E. G. *et al.* Lineage tracing reveals dynamic changes in oligodendrocyte precursor cells following cuprizone-induced demyelination. **Glia**, v. 65, p. 2087–2098, 2017.

BELSHE, R. B. *et al.* Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. **Journal of virology**, v. 62, n. 5, p. 1508-1512, 1988.

BJELOBABA, I.; BEGOVIC-KUPRESANIN, V.; LAVRNJA, I. Animals models of multiple sclerosis: focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neurosci. Res.**, v. 96, p. 1021-1042, 2018.

BLAKEMORE W.F.; FRANKLIN R.J.M. Remyelination in Experimental Models of Toxin-Induced Demyelination. *In*: RODRIGUEZ, M. (ed.). **Advances in multiple Sclerosis and Experimental Demyelinating Diseases: Current Topics in Microbiology and Immunology**. Berlin: Springer, 2008, v. 318.

BLAKEMORE, W. F. Observations on remyelination in the rabbit spinal cord following demyelination induced by lysolecithin. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 4, n. 1, p. 47-59, 1978.

BROCKSCHNIEDER, Damian *et al.* An improved mouse line for Cre- induced cell ablation due to diphtheria toxin A, expressed from the Rosa26 locus. **Genesis**, v. 44, n. 7, p. 322-327, 2006.

BROCKSCHNIEDER, Damian *et al.* Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 17, p. 7636-7642, 2004.

BROCKSCHNIEDER, Damian *et al.* Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 17, p. 7636-7642, 2004.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

CUNHA, T .M., *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 401-407, Mar., 2004.

DOAN, Vivian *et al.* Abbreviated exposure to cuprizone is sufficient to induce demyelination and oligodendrocyte loss. **Journal of neuroscience research**, v. 91, n. 3, p. 363-373, 2013.

FOX, Robert J. *et al.* Multiple sclerosis: advances in understanding, diagnosing, and treating the underlying disease. **Cleveland Clinic journal of medicine**, v. 73, n. 1, p. 91, 2006.

FRANCO-PONS, Neus *et al.* Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. **Toxicology letters**, v. 169, n. 3, p. 205-213, 2007.

GAJOFATTO, Alberto *et al.* Clinical efficacy, safety, and tolerability of fingolimod for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. **Drug, healthcare and patient safety**, v. 7, p. 157, 2015.

GOLDBERG, Johannes *et al.* Anatomical distribution of cuprizone-induced lesions in C57BL6 mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 57, n. 2, p. 166-175, 2015.

GUDI, Viktoria *et al.* Glial response during cuprizone-induced de-and remyelination in the CNS: lessons learned. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 73, 2014.

HARRISON, B.M.; MCDONALD, W.I.; OCHOA, J. Remyelination in the central diphtheria toxin lesion. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 17, n. 3, p. 293-302, 1972.

HESSE, Amke *et al.* In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 2, p. 362-369, 2010.

HIBBITS, Norah *et al.* Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. **ASN neuro**, v. 1, n. 3, p. AN20090032, 2009.

HÖFLICH, Katharina Marie *et al.* Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. **Brain research**, v. 1650, p. 125-133, 2016.

HORITA, N.; ISHII, T.; IZUMIYAMA, Y. Ultrastructure of 6-aminonicotinamide (6-AN)-induced lesions in the central nervous system of rats. **Acta neuropathologica**, v. 53, n. 3, p. 227-235, 1981.

KEOUGH, Michael B.; JENSEN, Samuel K.; YONG, V. Wee. Experimental demyelination and remyelination of murine spinal cord by focal injection of lysolecithin. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 97, p. e52679, 2015.

KHODANOVICH, Marina Y. *et al.* Plant polyphenols reduce demyelination and recover impaired oligodendrogenesis and neurogenesis in the cuprizone murine model of multiple sclerosis. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 5, p. 1363-1373, 2019.

Kipp, M., Clarner KIPP, Markus *et al.* The cuprizone animal model: new insights into an old story. **Acta neuropathologica**, v. 118, n. 6, p. 723-736, 2009., T., Dang, J. *et al.* *Acta Neuropathol* (2009) 118: 723.

KIPP, Markus *et al.* Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. **Brain Pathology**, v. 27, n. 2, p. 123-137, 2017.

LACHAPELLE, Yves *et al.* The relationship between quality of life and self-determination: an international study. **Journal of intellectual disability research**, v. 49, n. 10, p. 740-744, 2005.

LASSMANN, Hans; VAN HORSSSEN, Jack; MAHAD, Don. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 11, p. 647-656, 2012.

MASON, Jeffrey L. *et al.* Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 5, p. 1673-1682, 2004.

MATSUSHIMA, Glenn K.; MORELL, Pierre. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. **Brain pathology**, v. 11, n. 1, p. 107-116, 2001.

MCCARTHY D.P.; RICHARDS M.H.; MILLER S.D. Mouse Models of Multiple Sclerosis: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Theiler's Virus-Induced Demyelinating Disease. *In*: PERL, A. (ed.). **Autoimmunity: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. Totowa: Humana Press, 2012, v. 900.

MOREIRA, Marcos Aurélio *et al.* Esclerose múltipla: estudo descritivo de suas formas clínicas em 302 casos. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 58, n. 2B, p. 460-466, 2000.

O'NEILL, J. H. *et al.* Changes in the compact myelin of single internodes during axonal atrophy. **Acta neuropathologica**, v. 63, n. 4, p. 313-318, 1984.

PATEL, Jilpa; BALABANOV, Roumen. Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 8, p. 10647-10659, 2012.

PEDROSA, R. *et al.* **Introdução à Esclerose Múltipla**: elaborado pelo Grupo de Estudos de Esclerose Múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. Lisboa: Biogen Idec, 2010.

PRAET, Jelle *et al.* Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 485-505, 2014.

PRAET, Jelle *et al.* Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 485-505, 2014.

PRAET, Jelle *et al.* Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 485-505, 2014.

RÜTHER, Bernhard Josef *et al.* Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. **Glia**, v. 65, n. 12, p. 1900-1913, 2017..

SCHELD, Miriam *et al.* Neurodegeneration triggers peripheral immune cell recruitment into the forebrain. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 4, p. 1410-1415, 2016.

SCHNEIDER, H.; CERVOS-NAVARRO, J. Acute gliopathy in spinal cord and brain stem induced by 6-aminonicotinamide. **Acta neuropathologica**, v. 27, n. 1, p. 11-23, 1974.

SHAW, Patrick J. *et al.* A sinalização através da proteína adaptadora RIP2 nas células dendríticas infiltradas no sistema nervoso central promove inflamação e autoimunidade. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 75-84, 2011.

SHIELDS, Simon A. *et al.* Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination. **Glia**, v. 28, n. 1, p. 77-83, 1999. TAYLOR, Lorelei C.; GILMORE, Wendy; MATSUSHIMA, Glenn K. SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. **Brain Pathology**, v. 19, n. 3, p. 467-479, 2009.

SKRIPULETZ, Thomas *et al.* Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. **The American journal of pathology**, v. 172, n. 4, p. 1053-1061, 2008.

SKRIPULETZ, Thomas *et al.* Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. **The American journal of pathology**, v. 172, n. 4, p. 1053-1061, 2008..

SMITH, K. J.; HALL, S. M. Central demyelination induced in vivo by the calcium ionophore ionomycin. **Brain**, v. 117, n. 6, p. 1351-1356, 1994.

TROTTER, Jacqueline; SMITH, Marion Edmonds. The role of phospholipases from inflammatory macrophages in demyelination. **Neurochemical research**, v. 11, n. 3, p. 349-361, 1986.

WOODRUFF, Rachel H.; FRANKLIN, Robin JM. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following

stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study. **Glia**, v. 25, n. 3, p. 216-228, 1999.

YALDIZLI, Özgür *et al.* The relationship between total and regional corpus callosum atrophy, cognitive impairment and fatigue in multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 20, n. 3, p. 356-364, 2014.

YAMASAKI, Ryo *et al.* Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1533-1549, 2014.

ZURAWSKI, Jonathan; STANKIEWICZ, James. Multiple sclerosis re-examined: essential and emerging clinical concepts. **The American journal of medicine**, v. 131, n. 5, p. 464-472, 2018.

APÊNDICE

- Descrição da parte prática realizada durante o estágio de Especialização.
- Experimento realizado para avaliação da sensibilidade dolorosa camundongos C57BL/6.

1. Descrição da parte prática realizada durante o estágio de Especialização. A partir de junho iniciou-se a prática profissional no Laboratório de Dor e Sinalização do Instituto Butantan sob orientação da Doutora Gisele Picolo.

Uma das linhas de pesquisa do laboratório é o tratamento da dor na Esclerose Múltipla com toxinas animais, bem como avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito destas toxinas. Este estudo despertou meu interesse desde o princípio, portanto acompanhei seu desenvolvimento e foquei meu aprendizado neste tema.

Inicialmente foi realizado o aprendizado da manipulação de animais (camundongos) no biotério do laboratório de Dor e Sinalização do Instituto Butantan, onde aprendi as diferentes vias de administração de drogas em camundongos, auxiliada pela pós-doutoranda do laboratório Louise Vieira. A seguir, aprendi como são realizados os cortes histológicos de gânglios da raiz dorsal da medula espinal, no equipamento criostato também supervisionados pela pós-doutoranda Louise Vieira. Nos gânglios da raiz dorsal é que estão localizados os corpos celulares de neurônios que conduzem dor. Meu treinamento na administração de compostos por diferentes vias (subcutânea, intraperitoneal, oral e endovenosa) bem como a realização de cortes histológicos durou duas semanas.

Na sequência tive a oportunidade de acompanhar todo o processo de indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE) nos animais, juntamente com as doutorandas Aline Gardini e Morena Brazil Martins Sant'Anna. Neste processo, pude aprender a preparar o protocolo de imunização (com o cálculo das doses e concentrações dos compostos utilizados), o preparo dos compostos (imunógeno, que consiste em 200 ug de MOG35-55 em adjuvante incompleto de Freund, contendo 5 mg/ml de M.

tuberculosis, bem como 200 ng de toxina pertussis injetada em 0 e 48 h após a imunização.

Acompanhei a imunização dos animais bem como a avaliação das alterações de sensibilidade dolorosa e a evolução dos sinais clínicos.

Os sinais clínicos foram avaliados por um score clínico de 0 a 5, sendo 0, ausência de sintomas; 1, perda do tônus da cauda; 2, paralisia parcial dos membros posteriores; 3, paralisia total de membros posteriores; 4, paralisia total dos membros posteriores e parcial dos anteriores; 5, diminuição da responsividade e morte (eutanásia). Animais que receberam grau 4 foram avaliados 2 vezes ao dia e foram eutanasiados na ocorrência de três graus 4 consecutivos.

2. Avaliação da sensibilidade dolorosa de camundongos C57BL/6 pelo modelo do Von Frey eletrônico.

Em paralelo ao descrito acima, houve um treinamento contínuo no modelo do Von Frey eletrônico (Figura 1) para aprendizado de avaliação da sensibilidade dolorosa de animais frente a um estímulo mecânico, segundo o descrito por Cunha. (Cunha *et al*/2004)

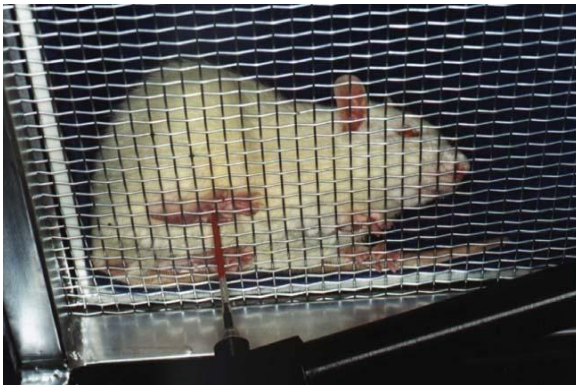
Para a realização do teste de Von Frey eletrônico no dia do experimento, os animais foram colocados em caixas de acrílico, suspensas aproximadamente 30 cm da bancada, com fundo de arame, para permitir acesso às patas, 30 minutos antes para adaptação. O experimento então foi iniciado quando os animais permaneceram quietos, porém ser dormir. Foram realizadas três medidas com o equipamento de Von Frey na pata direita traseira dos camundongos, que consistiu em estimulação da pata do animal, e estes, quando apresentavam dor, apresentavam uma resposta de retirada da pata, e neste momento o equipamento registrava a força (g) necessária para esta reação. A estimulação foi repetida até obter-se três medidas similares.

Após a realização da medida inicial, os animais foram injetados com carragenina (0,7 mg em 200 μ l) por via intraplantar. Duas horas após, os

animais receberam morfina (1,0 mg em 400 μ l), por via subcutânea, ou salina como controle. Uma hora após, foi realizada medida final.

Os resultados demonstram que a carragenina induz redução no limiar nociceptivo dos animais, acarretando hiperalgesia (indicativo de dor), enquanto a morfina não só reverteu a hiperalgesia mas também induziu aumento no limiar em relação a medida inicial (Figura 2), confirmando assim seu efeito analgésico e o aprendizado da metodologia.

Figura SEQ Figura * ARABIC 1 - Teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico)

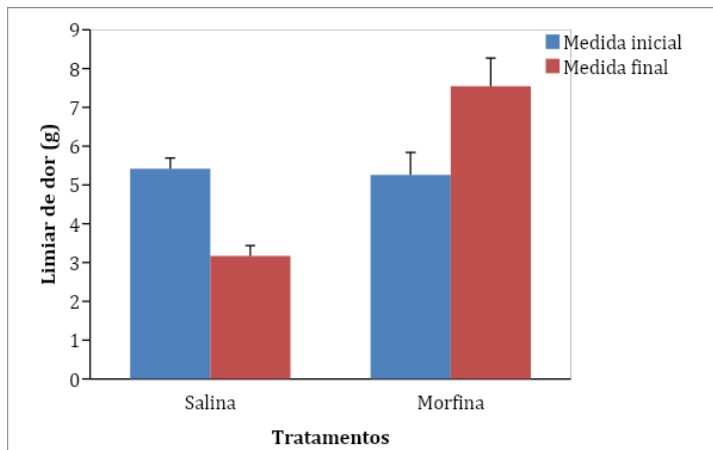


Fonte: DOR ONLINE. **Métodos experimentais para o estudo da dor**, [2014]. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/Html/MetodosExperimentais.html>. Acesso em: 23 jan. 2020.

Figura SEQ Figura * ARABIC 2 - Teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico)



Fonte: DOR ONLINE. **Métodos experimentais para o estudo da dor**, [2014]. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/Html/MetodosExperimentais.html>. Acesso em: 23 jan. 2020.



Fonte: própria autora.

Figura 3 - Limiar noceptivo de dor – Avaliação das alterações na sensibilidade dolorosa de animais imunizados por carragenina. A sensibilidade dolorosa dos animais foi avaliada pelo modelo de von Frey eletrônico. Os animais foram injetados com carragenina (0,7 mg em 200 ul) por via intraplantar. Duas horas após, os animais receberam morfina (1,0 mg em 400 ul), por via subcutânea, ou salina como controle. Uma hora após, os animais foram avaliados diariamente quanto à sensibilidade dolorosa. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 4 animais por grupos. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.