



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIÓLOGICAS:
NEUROCIÊNCIAS

Guilherme Bauer Negrini

ANÁLISE COMPORTAMENTAL E DE PARÂMETROS SINÁPTICOS E
IMUNOLÓGICOS NA LINHAGEM DE CAMUNDONGOS BALB/C *NUDE*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS

ANÁLISE COMPORTAMENTAL E DE PARÂMETROS SINÁPTICOS E
IMUNOLÓGICOS NA LINHAGEM DE CAMUNDONGOS BALB/C *NUDE*

Dissertação de mestrado apresentada ao
PPG Neurociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Neurociências.

GUILHERME BAUER NEGRINI

ORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a. Carmem Juracy Silveira Gottfried

Porto Alegre

2018

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Carmem, pela orientação e pelos incentivos, não somente nesses dois anos de mestrado, mas nos cinco anos que faço parte do PNG. Obrigado pela confiança e pelas oportunidades, as quais espero sempre honrar.

Sou muito grato aos meus pais, Ismael e Marilene, aos quais devo absolutamente tudo. Sem vocês não teria trilhado esse ou qualquer outro caminho. Obrigado pelo amor incondicional e pelo apoio para as minhas conquistas.

Agradeço a Luísa, minha noiva e futura esposa, por estar sempre ao meu lado e compartilhar as mesmas alegrias e angústias da profissão que escolhemos. Obrigado pelos teus sorrisos e por fazer dos momentos ao teu lado os melhores da vida. Obrigado meu amor, por todos os sonhos que podemos compartilhar juntos.

Ao Marco e a Eliane, meus sogros, pela companhia de todos os dias. Não tenho palavras para agradecer o carinho de vocês.

Agradeço aos amigos Thomas, pela parceria que não diminui mesmo com a distância, e Zeca, pelo companheirismo em todos os momentos, mas em especial nas conquistas do nosso tricolor.

Sou muito grato às incríveis funcionárias da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por todo apoio durante o projeto e pela dedicação que demonstram no seu trabalho.

Por fim, agradeço aos meus amigos de laboratório, os quais são presença diária nas vitórias e nas derrotas da vida científica. Obrigado pela convivência e por tornarem os dias mais divertidos.

*“Transmita o que aprendeu. Força, mestria. Mas fraqueza, insensatez,
fracasso também. O maior professor, o fracasso é.”*

Mestre Yoda

Resumo

Experimentos realizados na metade do século XX introduziram o conceito do sistema nervoso central (SNC) como local “imunologicamente privilegiado”, pois o parênquima cerebral possuía tolerância a enxertos heterólogos, diferentemente dos tecidos periféricos. De fato, o SNC possui características que o diferenciam imunologicamente de outros tecidos e durante muito tempo acreditou-se que a presença de células e fatores solúveis imunológicos no SNC possuía apenas consequências prejudiciais. Entretanto, a relação entre esses dois sistemas é mais complexa do que inicialmente imaginada e não está envolvida apenas em casos deletérios, com recentes evidências apontando para um papel fundamental das células T na função encefálica adequada. O presente trabalho visa investigar 1) o impacto da imunodeficiência de células T em camundongos atímicos *nude* sobre comportamentos relevantes para o estudo de transtornos do neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricos, e 2) avaliar parâmetros sinápticos de excitação/inibição e citocinas moduladoras de tais comportamentos no córtex pré-frontal medial. Foi encontrado um padrão complexo de alterações comportamentais em diferentes domínios (repetitivo/estereotipado, nociceptivo e social), além de redução da proteína sináptica excitatória PSD-95 e diminuição da expressão gênica de IFN- γ , uma importante citocina moduladora do comportamento social, no córtex pré-frontal dos animais imunodeficientes. A redução da expressão gênica de IFN- γ no córtex pré-frontal dos camundongos *nude* e uma potencial ausência de células T secretoras de IFN- γ nas meninges poderiam estar relacionados com os déficits sociais encontrados. A redução do imunoconteúdo de PSD-95 no córtex pré-frontal não parece estar de acordo com as observações de prejuízos sociais causados por hiperexcitabilidade, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na alteração encontrada. Concluímos com presente trabalho que a linhagem BALB/c *nude* oferece potencial para o estudo de interações neuroimunológicas, embora ainda seja necessária uma caracterização comportamental mais completa e avaliação da eletrofisiologia cortical desses animais para compreensão dos mecanismos envolvendo o equilíbrio excitatório/inibitório e a imunodeficiência de células T nas alterações encontradas.

Abstract

Experiments performed in the mid-twentieth century introduced the concept of the central nervous system (CNS) as an "immunologically privileged" site, since the brain parenchyma had tolerance to heterologous grafts, unlike peripheral tissues. Indeed, the CNS has features that immunologically differentiate it from other tissues and it has long been believed that the presence of soluble cells and immune factors in the CNS had only detrimental consequences. However, the relationship between these two systems is more complex than initially imagined and is not involved only in deleterious cases, with recent evidence pointing to a key role of T cells in adequate brain function. In the present work, we aimed 1) to investigate the impact of T-cell immunodeficiency on athymic nude mice on behaviors relevant to the study of neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders and 2) to evaluate excitatory/inhibitory synaptic parameters and cytokines modulating such behaviors in the medial prefrontal cortex. A complex pattern of behavioral changes was found in different domains (repetitive/stereotyped, nociceptive and social), as well as a reduction in the PSD-95 excitatory synaptic protein and a decrease in the gene expression of IFN- γ , an important social behavior modulating cytokine on the prefrontal cortex of immunodeficient animals. Reduced IFN- γ gene expression on the prefrontal cortex of nude mice and a potential absence of IFN- γ -secreting T cells in the meninges could be related to the social deficits observed. Reduction of the PSD-95 immunocontent on the prefrontal cortex does not appear to be in agreement with observations of social impairment caused by hyperexcitability, suggesting that other mechanisms may be involved in the that alteration. In conclusion, the BALB/c nude strain offers potential to the study of neuroimmune interactions, although a more complete behavioral characterization and evaluation of the cortical electrophysiology of these animals is necessary to understand the mechanisms involving the excitatory/inhibitory balance and the T cell immunodeficiency in the alterations observed.

Lista de abreviaturas

ACK – Amônio-Cloreto-Potássio, do inglês *Ammonium-Chloride-Potassium*.

BSA – Albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumin*.

CD – Grupamento de diferenciação, do inglês *cluster of differentiation*.

cDNA – DNA complementar.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Ct – Ciclo limiar, do inglês *threshold cycle*.

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*.

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados, do inglês *deoxynucleoside triphosphates*.

DTT – Ditioneitol.

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*.

FSC-A – Área da distribuição horizontal, do inglês *forward scatter area*.

FSC-W – Largura da distribuição horizontal, do inglês *forward scatter area*.

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

GEE – Equações de Estimações Generalizadas, do inglês *generalized estimating equations*.

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

HLA – Antígeno leucocitário humano, do inglês *human leukocyte antigen*.

Iba1 – Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1, do inglês *ionized calcium binding adaptor molecule 1*.

IFN- γ – Interferon gama.

IL – Interleucina.

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês *major histocompatibility complex*.

M-MLV – Vírus da leucemia murina de Moloney, do inglês *Moloney murine leukemia virus*.

NIH – Institutos Nacionais da Saúde, do inglês *National Institutes of Health*.

PBS – Solução salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*.

PSD-95 – Proteína de 95 kDa da densidade pós-sináptica, do inglês *postsynaptic density protein 95*.

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*.

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês *messenger ribonucleic acid*.

RT-qPCR – Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa.

SCID – imunodeficiência combinada grave, do inglês *severe combined immunodeficiency*.

SNC – Sistema nervoso central.

SSC-A – Área de distribuição lateral, do inglês *side scatter area*.

TBS – Solução salina tamponada com Tris, do inglês *Tris-buffered saline*.

TCR – receptor de célula T, do inglês *T-cell receptor*.

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*.

TTBS – Solução salina tamponada com fosfato, contendo detergente Tween 20, do inglês *Tween-Tris-buffered saline*.

UEA – Unidade de Experimentação Animal.

Lista de figuras

Figura 1 - Drenagem linfática no sistema nervoso central.....	3
Figura 2 - Interações entre sistema imunológico e o SNC podem causar alterações comportamentais.....	5
Figura 3 - Imagem representativa de camundongos BALB/c <i>nude</i> +/- e -/-.....	7
Figura 4 - Desenho experimental dos testes comportamentais.....	11
Figura 5 - Alterações no comportamento repetitivo/estereotipado de autolimpeza. ...	20
Figura 6 - Alteração no comportamento de enterramento de bolinhas.....	21
Figura 7 - Limiar de nocicepção térmica.....	21
Figura 8 - Alteração no comportamento social	24
Figura 10 - Imunoconteúdo de proteínas sinápticas.....	25
Figura 11 - Expressão gênica relativa de IFN- γ e TNF- α	25
Figura 12 - Células T CD3+ nas meninges	26

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sequências de <i>primers</i> utilizados.....	17
Tabela 2 - Pesos absolutos e relativos de órgãos linfoides.....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistema imunológico	1
1.2. Relações entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central	2
1.2.1. Privilégio imunológico no sistema nervoso central	2
1.2.2. O envolvimento do sistema imunológico em alterações comportamentais	4
1.3. Camundongos imunodeficientes BALB/c <i>nude</i>	6
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo geral	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Animais.....	10
3.2. Aspectos éticos	10
3.3. Testes comportamentais	11
3.3.1. Procedimentos gerais	11
3.3.2. Campo aberto (<i>open field</i>)	12
3.3.3. Comportamento repetitivo de autolimpeza (<i>repetitive self-grooming</i>)....	12
3.3.4. Teste de enterramento de bolinhas (<i>marble burying</i>)	12
3.3.5. Teste de retirada da cauda (<i>tail-flick</i>).....	12
3.3.6. Teste de sociabilidade de 3 câmaras	13
3.4. Eutanásia e preparação de amostras.....	13
3.5. Citometria de fluxo.....	14
3.6. Eletroforese e análise de imunoconteúdo de proteínas.....	14

3.6.1. Anticorpos utilizados.....	15
3.7. Análise de expressão gênica.....	16
3.7.1. Extração de RNA total	16
3.7.2. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR).....	16
3.8. Imunofluorescência	17
3.9. Cuidados de biossegurança e descarte de materiais e resíduos	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Locomoção e comportamentos repetitivos/estereotipados.....	19
4.2. Resposta à nocicepção térmica.....	21
4.3. Comportamento social.....	22
4.4. Análise de órgãos linfoides e perfil de células T e B	22
4.5. Imunoconteúdo de proteínas sinápticas	24
4.6. Expressão gênica	25
4.7. Células T meníngeas.....	26
5. DISCUSSÃO	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	42
ANEXO 1 - Cartas de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema imunológico

O sistema imunológico é composto por uma rede de interações entre órgãos linfoides, células, fatores humorais e citocinas, tendo como principal função a proteção contra substâncias estranhas, microrganismos, patógenos e parasitas (Kierszbaum, 2004). Os órgãos linfoides podem ser classificados em primários e secundários. Órgãos linfoides primários são os locais onde acontece o desenvolvimento de células precursoras em linfócitos maduros, como a medula óssea, local de origem e diferenciação inicial dos linfócitos; e o timo, onde os timócitos se diferenciam em linfócitos T maduros. Órgãos linfoides secundários são locais onde os linfócitos interagem entre si ou com outras células para gerar respostas contra antígenos, como o baço e os linfonodos (Kipps, 2010).

A imunidade pode ser dividida de forma geral em duas classificações, inata/natural e adaptativa/adquirida. A imunidade inata é o mecanismo mais simples e conservado na evolução, constituindo uma resposta rápida e sem necessidade de exposição prévia ao patógeno. É composta pela barreira epitelial, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células *natural killer* (NK), proteínas do sistema complemento e citocinas. A imunidade adaptativa é caracterizada por reações antígeno específicas envolvendo receptores de células T e B, e é uma resposta mais demorada em comparação à imunidade inata, porém mais específica e com produção de memória imunológica (Parkin & Cohen, 2001). A imunidade adaptativa pode ainda ser dividida em imunidade humoral, mediada por anticorpos secretados por plasmócitos (linfócitos B diferenciados), promovendo a ação fagocitária de macrófagos e recrutamento de granulócitos; e imunidade celular, que envolve a captação do patógeno por uma célula fagocitária e apresentação de antígenos para os linfócitos T, cujo reconhecimento é feito pelo receptor de linfócito T (TCR).

As células apresentadoras de antígeno internalizam possíveis patógenos e os fragmentam em peptídeos antigênicos que serão expostos por moléculas de superfície, denominadas de complexo principal de histocompatibilidade (MHC ou

HLA – antígenos leucocitários de humanos – em humanos), para reconhecimento pelo TCR dos linfócitos T. Existem dois tipos de MHC, variando na estrutura das cadeias polipeptídicas que os constituem: MHC de classe I, expressado por todas as células nucleadas; MHC de classe II, expresso pelas células apresentadoras de antígeno, células reticuloepiteliais do timo e células endoteliais (Kierszbaum, 2004).

Além do TCR, existem outras proteínas que atuam no reconhecimento do MHC, chamadas de co-receptores, com função de estabilizar a ligação das células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T. As moléculas CD4 e CD8 estão presentes na superfície das células T e fazem parte, respectivamente, da sinalização de linfócitos T auxiliares CD4+ e linfócitos T citotóxicos CD8+ no reconhecimento de antígenos associados ao MHC de classe II e de classe I (Kierszbaum, 2004).

1.2. Relações entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central

1.2.1. Privilégio imunológico no sistema nervoso central

Experimentos realizados na metade do século XX introduziram o conceito do sistema nervoso central (SNC) como local “imunologicamente privilegiado”, pois o parênquima cerebral possuía tolerância a enxertos heterólogos, diferentemente dos tecidos periféricos (Widner & Brundin, 1988). De fato, o SNC possui características que o diferenciam imunologicamente de outros tecidos, como ausência de células apresentadoras de antígenos profissionais, baixa expressão de MHC I e II e a aparente ausência de drenagem linfática clássica (Louveau, Harris, et al., 2015). Além disso, a existência de uma barreira hematoencefálica contribui para o isolamento do SNC das respostas imunológicas periféricas. A resposta imunológica no tecido do parênquima encefálico dependeria apenas da microglia, célula derivada de macrófagos do saco vitelino primitivo (Ginhoux et al., 2010).

De forma surpreendente, Louveau e colaboradores (2015) demonstraram pela primeira vez a presença de vasos linfáticos nas meninges (dura-máter) capazes de transportar fluido e células do sistema imunológico do líquido cefalorraquidiano para linfonodos cervicais profundos (Figura 1). Essa descoberta vem possibilitando a

investigação de novas rotas e mecanismos envolvidos em interações neuroimunológicas.

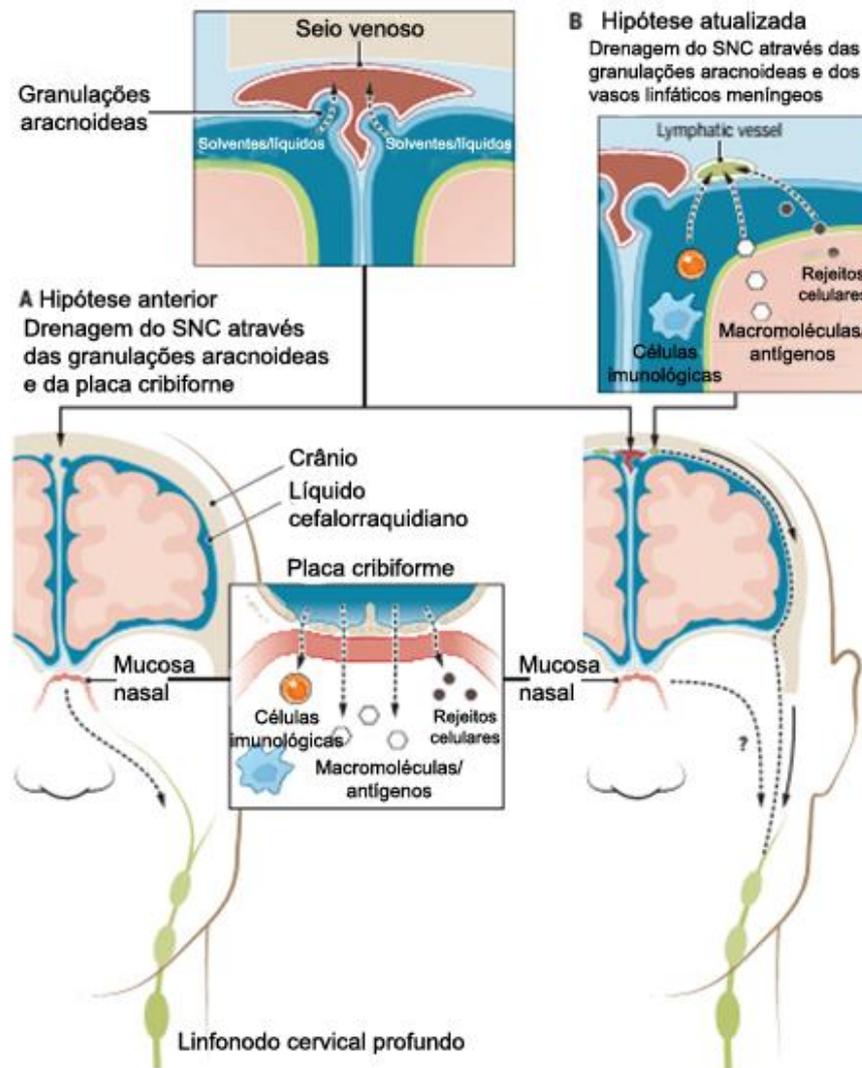


Figura 1 - Drenagem linfática no sistema nervoso central. (A) Antes da descoberta de vasos linfáticos meníngeos, o entendimento da drenagem no SNC se baseava na saída de líquido através das granulações aracnoideas, enquanto macromoléculas e células imunológicas do SNC e líquido cefalorraquidiano eram drenados através da placa cribiforme até a região linfática nasal e então para os linfonodos cervicais profundos. (B) A nova descoberta demonstra um novo mecanismo, no qual a drenagem de macromoléculas e células do parênquima cerebral e do líquido cefalorraquidiano é realizada diretamente para os linfonodos cervicais profundos através dos vasos linfáticos meníngeos. Adaptado de Kipnis (2016).

1.2.2. O envolvimento do sistema imunológico em alterações comportamentais

Durante muito tempo acreditou-se que a presença de células e fatores solúveis imunológicos no SNC possuía apenas consequências prejudiciais. O exemplo mais clássico é o comportamento de doença (*sickness behavior*), observado em casos de infecção periférica, a qual causa uma resposta imunológica sistêmica acompanhada de elevação de citocinas pró-inflamatórias que afetam a função encefálica, desencadeando alterações comportamentais, tais como perda de apetite, letargia e retraimento social (Filiano et al., 2015). Também podem ser observados os efeitos devastadores de uma resposta autoimune contra componentes do SNC como no caso da esclerose múltipla, doença desmielinizante cujo complexo papel de células T CD4+ é certamente prejudicial (Kipnis, 2016). Além disso, nas últimas duas décadas, foi evidenciada a importante influência de componentes imunológicos em distúrbios neurodegenerativos, e transtornos neuropsiquiátricos e do neurodesenvolvimento, tais como doença de Alzheimer (Varley et al., 2015), esquizofrenia (Pasternak et al., 2015), depressão (Réus et al., 2015) e transtorno do espectro autista (Gottfried et al., 2015; Onore et al., 2012). Em especial, no caso do transtorno do espectro autista, cujas alterações comportamentais envolvem diminuição da sociabilidade e presença de estereotípias, há relatos da redução na proporção e quantidade de células T CD4+ e total de linfócitos em pacientes (Yonk et al., 1990), além de ratos de modelos animais com timo reduzido (Schneider & Przewłocki, 2005). A Figura 2 exemplifica alguns mecanismos envolvidos em alterações comportamentais, as quais estão presentes em muitas das desordens citadas, causadas por desregulações no sistema imunológico.

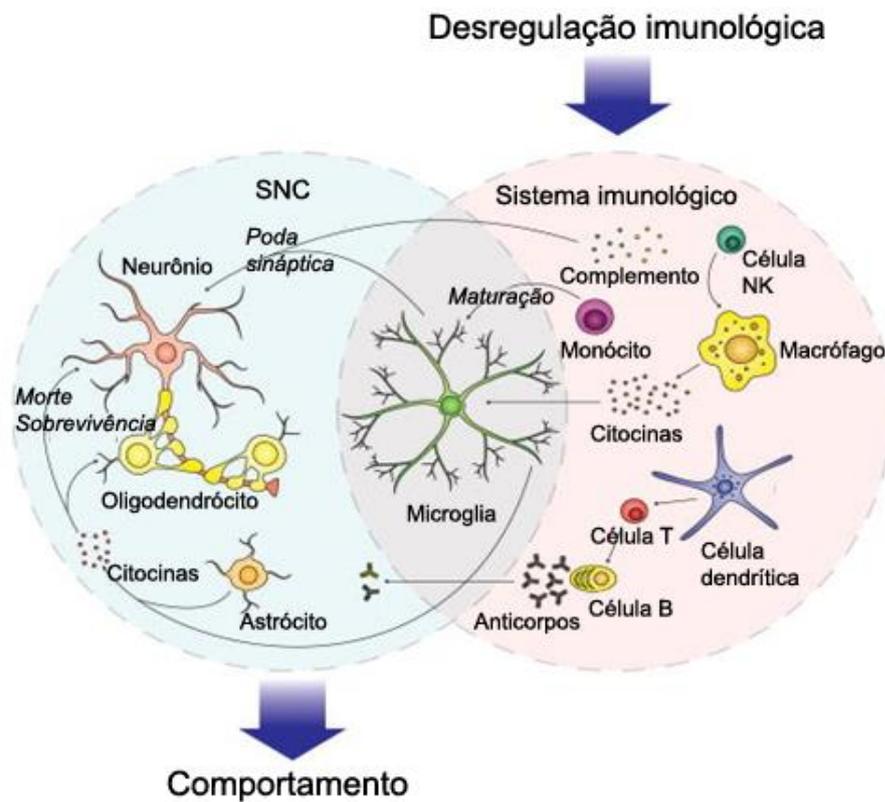


Figura 2 - Interações entre sistema imunológico e o SNC podem causar alterações comportamentais. Desregulação imunológica pode alterar componentes do SNC através de: secreção de citocinas, as quais podem promover morte ou proliferação celular; anticorpos reativos para proteínas do SNC; sistema complemento, podendo opsonizar sinapses e estimular a poda sináptica pela microglia; e migração celular e neuroinflamação. Adaptado de Onore *et. al* (2012).

Entretanto, a relação entre esses dois sistemas é mais complexa do que inicialmente imaginada e não está envolvida apenas em casos deletérios. Camundongos treinados em tarefas cognitivas apresentam elevação nos níveis de células T CD4+ e interleucina-4 (IL-4) na região das meninges, e o bloqueio dessa alteração é suficiente para causar prejuízos cognitivos (Derecki *et al.*, 2010). Além disso, a remoção de linfonodos cervicais profundos, os quais drenam o sistema nervoso central, interrompe o fluxo normal de células T meníngeas e resulta em prejuízos cognitivos (Radjavi *et al.*, 2014).

Evidências sugerem que o recrutamento de células T e a ativação microglial estão associadas à manutenção da neurogênese no hipocampo e à habilidade de aprendizado espacial (Ziv *et al.*, 2006). Interessantemente, linhagens de

camundongos gravemente imunodeficientes (ausência de células T, B e NK) apresentam déficits de aprendizado, memória e comportamento social (Filiano et al., 2015, 2016). Até mesmo o comportamento materno de camundongos gravemente imunodeficientes difere de animais típicos, com mães passando menos tempo cuidando da prole e mais tempo afastadas do ninho (Quinnies et al., 2015).

Foi demonstrado em camundongos de modelo animal de doença de Alzheimer, que as células T promovem neurogênese hipocampal, através de um mecanismo mediado por aumento da expressão de células T periféricas e citocinas microgliais, e que tal regeneração é bloqueada em animais imunodeficientes (Liu et al., 2014). O comportamento ansioso e do tipo depressivo em camundongos também parece ser modulado por células T regulatórias, pois uma depleção dessas células é capaz de causar aumento de ansiedade e maior imobilidade no teste de nado forçado, assim como diminuição dos níveis de serotonina no hipocampo e aumento da concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias (Kim et al., 2012).

Os mecanismos pelos quais as células T exercem seus efeitos no SNC ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, apesar dessas células não estarem presentes no parênquima cerebral em condições fisiológicas, sua presença nas meninges e na periferia é necessária para o funcionamento encefálico adequado, sendo os efeitos de sua ausência tão prejudiciais quanto uma ativação imunológica exacerbada (Filiano et al., 2017).

1.3. Camundongos imunodeficientes BALB/c *nude*

Camundongos homocigotos para a mutação *nude* ($Foxn1^{nu}$) possuem ausência de pelos e também disgenesia congênita do epitélio tímico, a qual resulta em uma imunodeficiência primária de células T maduras (Romano et al., 2012) (Figura 3). O epitélio tímico é necessário para a seleção de células T maduras, portanto tal atrofia resulta na deficiência de linfócitos T circulantes, tornando os animais *nude* mais suscetíveis a quadros infecciosos e com redução da expectativa de vida (Boehm et al., 1995). Conforme envelhecem, o número de células T maduras circulantes aumenta devido a mecanismos ainda não completamente elucidados de maturação extra tímica (Palacios & Samaridis, 1991). A população de linfócitos é quase totalmente constituída de células B, a função de células NK e de macrófagos

aparenta ser mais elevada (Cheers & Waller, 1975; Hasui et al., 1989), enquanto a função de mastócitos permanece normal (Wlodarski et al., 1982).



Figura 3 - Imagem representativa de camundongos BALB/c *nude* heterozigoto (+/-) com timo (animal da esquerda, com pelo) e homozigoto (-/-) sem timo (animal da direita, sem pelo).

Apesar de utilizado há décadas, principalmente em pesquisas com enxertos tumorais, devido à ausência de rejeição tecidual (Morton & Houghton, 2007), a linhagem *nude* pode ser uma ferramenta interessante para o estudo do impacto da imunodeficiência de células T no SNC. Os primeiros estudos sobre o SNC desses animais revelaram uma redução na espessura cortical no lobo frontal/lateral e redução no número de oligodendrócitos no lobo occipital (Diamond et al., 1986), assim como uma redução na espessura cortical no lobo frontal e frontal/parietal (áreas motoras e somatossensoriais), a qual pôde ser revertida após enxerto de timo (Gaufo & Diamond, 1997).

A exposição a pequenas doses de tolueno em camundongos induz um aumento na expressão de RNAm de genes relacionados a memória (CAMKII, CREB, NMDAr) no hipocampo, assim como marcadores de células T CD3+. Interessantemente, tais resultados não foram observados em camundongos *nude*, sugerindo que a expressão de genes relacionados a memória induzida por tolueno é dependente do recrutamento de células T no hipocampo (Win-Shwe et al., 2007). Além disso, a ausência de células T parece deixar os animais *nude* mais suscetíveis

aos efeitos deletérios de convulsões induzidas por pilocarpina, elevando os níveis de glutamato e morte celular no hipocampo (Vignoli et al., 2012).

Diante da imunodeficiência apresentada pelo camundongo BALB/c *nude* e do conjunto de evidências demonstrando as relações entre células T e comportamento, torna-se relevante o uso dessa linhagem para estudos de interações neuroimunológicas. A avaliação de diferentes comportamentos possivelmente alterados nesses animais, assim como potenciais mecanismos envolvidos, em especial componentes sinápticos de excitação/inibição cortical e citocinas moduladoras, pode contribuir para a elucidação da etiologia e envolvimento do sistema imunológico em transtornos do neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o impacto da imunodeficiência de células T em camundongos atímicos *nude* sobre comportamentos relevantes para o estudo de transtornos do neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricos, assim como em parâmetros sinápticos de excitação/inibição e citocinas moduladoras de tais comportamentos no córtex pré-frontal.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar os comportamentos locomotor, repetitivo/estereotipado, de resposta à nocicepção e social.
- b) Quantificar os percentuais de células T CD3+ (linfócitos T) e B CD19+ (linfócitos B) no baço e *pool* de linfonodos subcutâneos.
- c) Avaliar o imunconteúdo das proteínas sinápticas PSD-95 (componente pós-sináptico excitatório), gefirina (componente pós-sináptico inibitório) e sinaptofisina (componente pré-sináptico) no córtex pré-frontal.
- d) Avaliar a expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ e TNF- α no córtex pré-frontal.
- e) Observar a presença de células T CD3+ nas meninges.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c *nude* foram obtidos da colônia da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com 28 dias de idade pós-natais (P28) a partir do cruzamento de machos homocigotos (-/-) com fêmeas heterocigotas (+/-). A partir de agora, sempre que a palavra *nude* fizer referência à linhagem, aparecerá em itálico (*nude*) e quando fizer referência ao grupo homocigoto (sem timo), aparecerá com a grafia normal (*nude*). Dessa forma, os grupos experimentais compreendem o grupo controle (heterocigotos +/- com timo e com pelo) e grupo *nude* (homocigotos -/- sem timo e sem pelo). Os animais foram separados por ninhadas e mantidos em microisoladores de policarbonato ventilados individualmente, temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (40-60%) controladas, sistema de exaustão de ar e ciclo de claro:escuro de 12:12 horas. Ração, sementes de girassol e água previamente submetidos à autoclavagem eram fornecidos aos animais *ad libitum*. Os camundongos de uma ninhada eram mantidos em grupos de 3-4 animais (pelo menos 1 *nude* e 2 controles) para randomizar a influência da hierarquia social.

Camundongos CF1 com 21 dias de idade foram utilizados como animais de interação no teste de sociabilidade de 3 câmaras. Os animais foram mantidos nas mesmas condições de biotério descritas.

3.2. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados obedecendo aos preceitos éticos que competem à experimentação animal e estão de acordo com o NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, com as últimas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do HCPA (ANEXO 1). Foram considerados os “Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Envolvendo Animais”, tais como a relevância do projeto para a saúde humana e animal e avanço do conhecimento; uso da espécie e quantidade apropriada; minimização de desconforto e dor; e uso apropriado de sedação e anestesia (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care

and Use of Laboratory, 2011). Toda a manipulação animal foi realizada com base na Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 e na Resolução Normativa N.30 de 2 de fevereiro de 2016 do CONCEA.

O procedimento de eutanásia dos animais seguiu as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Resolução Normativa N. 13, 2013). A eutanásia foi realizada por sobredose anestésica com isoflurano, fornecido em concentrações 3 vezes maiores (6 a 9%) que a concentração necessária para obtenção de plano anestésico-cirúrgico (2 a 3%). Os sinais clínicos condizentes com óbito (ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal) foram monitorados por um período adicional de 10 minutos após a parada respiratória.

3.3. Testes comportamentais

3.3.1. Procedimentos gerais

Cuidados especiais foram tomados com toda a manipulação animal devido à imunodeficiência dos animais *nude*. Todos os testes comportamentais e as manipulações foram realizadas no interior de uma capela de fluxo laminar com objetos e superfícies descontaminadas com álcool 70% e esterilizadas com luz UV.

Os testes foram realizados em salas de comportamento com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), iluminação próxima a 60 lux e durante o período da tarde (13h – 17h). Os animais eram habituados por 30 minutos à sala antes do início dos procedimentos de cada teste descrito.

Todos os animais foram submetidos à bateria de testes comportamentais na sequência e no intervalo de idade indicados no desenho experimental abaixo:

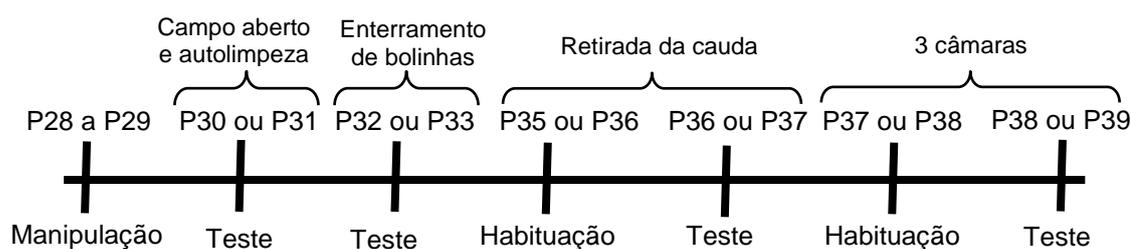


Figura 4 - Desenho experimental dos testes comportamentais.

3.3.2. Campo aberto (*open field*)

A atividade locomotora dos animais foi avaliada em um monitor de atividades automático (Insight EP 149, Brasil) com dimensões de 50 cm por 50 cm. Os camundongos foram colocados individualmente no aparato para exploração por 30 minutos. Os parâmetros de distância total percorrida, velocidade média, tempo no centro, frequência de *rearings* e movimentos instáveis foram gravados pelo aparelho. O período de teste também foi gravado em vídeo para a análise posterior do comportamento repetitivo de autolimpeza.

3.3.3. Comportamento repetitivo de autolimpeza (*repetitive self-grooming*)

O comportamento repetitivo de autolimpeza espontânea dos animais foi observado em vídeo para avaliação das quantidades, tempos de duração e tipo de cada movimento (incompleto ou completo), adaptado de (Kalueff et al., 2007). A autolimpeza incompleta é caracterizada por movimentos de limpeza no focinho, orelhas e região da cabeça, enquanto na autolimpeza completa esses movimentos se estendem para regiões dorsais, ventrais e caudais.

3.3.4. Teste de enterramento de bolinhas (*marble burying*)

Os animais foram habituados individualmente por 10 minutos à caixa-teste (caixa moradia, sem alimentos e água) com 5 cm de altura de maravalha limpa. Após habituação, os animais foram removidos da caixa-teste e 20 bolinhas de vidro foram colocadas em um arranjo 4x5 (largura x comprimento). Os animais retornaram para a caixa teste contendo as bolinhas por um período de 10 minutos. Dois observadores independentes contavam o número de bolinhas enterradas (pelo menos 50% da superfície coberta por maravalha) (Baronio et al., 2015).

3.3.5. Teste de retirada da cauda (*tail-flick*)

Os animais foram contidos manualmente com o auxílio de um pano e a cauda colocada no filamento de aquecimento. A nocicepção térmica foi avaliada pela média de três medidas da latência de retirada da cauda, registradas em intervalos de 30 segundos (Baronio et al., 2015). Para evitar respostas de ansiedade induzida por

novidade, os animais foram habituados à contenção manual e ao equipamento no dia anterior do teste.

3.3.6. Teste de sociabilidade de 3 câmaras

A sociabilidade dos animais foi avaliada pelo teste de 3 câmaras, conforme descrito (Baronio et al., 2015). O aparato consiste em uma caixa de acrílico (628 mm de comprimento x 456 mm de largura x 220 mm de altura) com três compartimentos (câmaras). Os camundongos foram habituados à câmara central do aparato por 10 minutos no dia anterior ao teste e por 5 minutos no dia do teste. Durante o teste, uma das câmaras laterais continha uma gaiola de contenção vazia (chamada de objeto), enquanto a outra câmara lateral continha uma gaiola idêntica, porém contendo um camundongo menor e desconhecido (chamado de animal desconhecido) ao animal testado. O animal-teste era inserido no aparato, as portas laterais eram removidas e o animal era livre para explorar as câmaras por 10 minutos. O procedimento foi gravado em vídeo para posterior avaliação do tempo gasto em cada câmara e do tempo gasto explorando o objeto/animal desconhecido.

3.4. Eutanásia e preparação de amostras

Na idade de P40 os animais foram eutanasiados para a remoção de amostras biológicas. O baço e *pool* de linfonodos subcutâneos (inguinais, axilares e braquiais) foram removidos para a realização da técnica de citometria de fluxo. O córtex pré-frontal foi dissecado e o lado proveniente do hemisfério esquerdo foi imediatamente congelado à -80°C até análise de imunoconteúdo de proteínas, enquanto o lado proveniente do hemisfério direito foi homogeneizado em 200 µL de reagente TRIzol® (Invitrogen) para posterior análise de expressão gênica.

Para a técnica de marcação imunofluorescente nas meninges, antes da remoção do tecido, os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca com PBS para evitar a presença de células T da circulação sanguínea. Conforme o protocolo, (Louveau, Smirnov, et al., 2015) a cabeça do animal foi removida por decapitação e com auxílio de tesoura toda a pele e carne removidas para exposição do crânio. Utilizando tesoura foi realizado um corte em sentido horário a partir da mandíbula para remover a porção superior do crânio contendo as meninges. A estrutura foi

armazenada em paraformaldeído 4% por 48h para pós-fixação. Em seguida o tecido foi removido do interior da calota craniana com pinças e estendido em lâmina.

3.5. Citometria de fluxo

As amostras de baço e *pool* de linfonodos foram pesadas, dissociadas em solução PBS 0,1 M e centrifugadas a 1000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras de linfonodos foram ressuspensas em PBS, enquanto as de baço em tampão ACK (EDTA 0,1mM, NH₄Cl 0,15 mM, KHCO₃ 1 mM) para lise das hemácias. Após 5 minutos, as amostras de baço foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e então suspensas em PBS.

O número de células foi contado em uma câmara de Neubauer para o preparo de suspensões contendo 10⁶ células. As amostras foram bloqueadas com soro de camundongo e incubadas com os anticorpos anti-CD3-FITC (1:50) e anti-CD19-PerCp-Cy5.5 (1:100) (BD Biosciences) por 20 minutos à 4°C. Os dados foram obtidos com a passagem das amostras pelo citômetro Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies). Primeiramente foi realizada a separação dos eventos por *forward x side scatter* (FSC-A x SSC-A) para exclusão de restos celulares e seleção da janela de leitura (*gate*) da população compatível com linfócitos pelos parâmetros de tamanho da célula x complexidade interna (FSC-A x SSC-A). Após, células isoladas (*singlets*) foram selecionadas a partir da geometria do pulso (FSC-W x FSC-A) e então identificadas pelos marcadores utilizados (CD3+ para células T e CD19+ para células B).

3.6. Eletroforese e análise de imunoconteúdo de proteínas

As amostras de córtex pré-frontal foram homogeneizadas em tampão de extração de proteínas contendo Triton X-100, centrifugadas a 14000 g por 20 min a 4°C e tiveram o sobrenadante coletado. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) e preparadas em tampão Laemmli para uma quantidade de 40 µg de proteína por amostra. As amostras foram separadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (10%) e transferidas para membranas de nitrocelulose para detecção do imunoconteúdo de proteínas sinápticas, conforme protocolo prévio (Bristot Silvestrin et al., 2013). Em resumo, as

membranas foram bloqueadas em temperatura ambiente por 1h, utilizando 5% de albumina sérica bovina (BSA) dissolvida em salina tamponada com tampão Tris (TBS) adicionada de 0,1% de Tween-20 (TTBS). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários anti-PSD-95 (sinapses excitatórias), anti-gefirina (sinapses inibitórias), anti-sinaptofisina (sinapses) e anti- β -actina (controle endógeno). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes com TTBS e incubadas em temperatura ambiente por 2h com os anticorpos secundários, seguida de mais 3 lavagens. O substrato SuperSignal® West Pico (Thermo Fisher Scientific) foi aplicado nas membranas e o sinal quimioluminescente foi detectado utilizando sistema ImageQuant™ LAS 4000 (GE HealthCare Life Sciences). A quantificação da expressão relativa foi realizada com o *software* ImageJ (v. 1.51) e os dados foram normalizados pelo marcador endógeno.

3.6.1. Anticorpos utilizados

Anticorpos primários:

- anti-PSD-95 produzido em coelho, diluição de 1:500 em TTBS-BSA (Abcam, ab18258);
- anti-gefirina produzido em coelho, diluição de 1:500 em TTBS-BSA (Abcam, ab32206);
- anti-sinaptofisina produzido em camundongo, diluição de 1:1000 em TTBS-leite (SIGMA Aldrich, s5768);
- anti- β -actina produzido em coelho, diluição de 1:2000 em TTBS (Cell Signaling, D6A8 #8457).

Anticorpos secundários:

- anti-IgG de camundongo produzido em burro, diluição de 1:1000 em TTBS-leite (Santa Cruz Biotechnology, sc2314);
- anti-IgG de coelho produzido em cabra, diluição de 1:2000 em TTBS (Santa Cruz Biotechnology, sc2004).

3.7. Análise de expressão gênica

3.7.1. Extração de RNA total

A extração de RNA total das amostras de córtex pré-frontal armazenadas em TRIzol® foi iniciada com a adição de clorofórmio na proporção 1:5 (clorofórmio:TRIzol®) para promover a separação de fases, seguido de centrifugação a 12000 g a 4°C por 15 min. A fase aquosa foi coletada, o RNA total precipitado com adição de isopropanol na proporção 1:2 (isopropanol:TRIzol®) e a solução foi centrifugada novamente (12000 g, 4°C, 10 min). Após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em etanol na proporção 1:1 (etanol:TRIzol®) para remoção de impurezas. Por fim, após nova centrifugação (12000 g, 4°C, 5 min), o sobrenadante foi descartado, o precipitado contendo RNA foi ressuspendido em 30 µL de água livre de RNases e armazenado a -80°C.

3.7.2. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)

A partir do extrato de RNA obtido para cada amostra deu-se sequência à síntese de DNA complementar (cDNA) pela técnica da transcrição reversa. Primeiramente foi avaliada a quantidade e a qualidade dos extratos de RNA por espectrofotometria. Apenas amostras com índices $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$ maiores que 1,7 foram utilizadas.

Para a síntese de cDNA foram preparadas soluções contendo 2 µg de RNA total, 1 µL de *primer* oligodT, 1 µL de *mix* de dNTP a 10 mM e água para injetáveis em quantidade suficiente para 12 µL. Essa mistura foi incubada a 65°C por 5 min no termociclador. Após, foram adicionados 4 µL de tampão da transcrição reversa (M-MLV concentrado 5x), 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de inibidor de ribonucleases (40 unidades/µL), seguida de nova incubação a 37°C por 2 min. Por fim, 1 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) foi adicionado e uma incubação final a 37°C por 50 min seguida de inativação da reação a 70°C por 15 min foi realizada.

Para a reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) foram utilizados 10µL de cDNA (1:30) adicionados a 0,2 µL ou 0,4 µL de cada *primer* específico (a 10 µM cada), dependendo da concentração ideal testada para o RNAm

avaliado, e 13 μL de mistura de reação contendo: 2 μL de tampão (10x) da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,8 μL de cofator MgCl_2 (50 mM), 2 μL do fluoróforo SYBR® *green* (Molecular Probes) (diluído 10000x), 0,5 μL de mistura de cada dNTP (10 mM) e 0,1 μL da enzima Taq DNA polimerase e água para injetáveis suficiente para 20 μL de reação.

A fluorescência de SYBR® *green* foi utilizada para detectar a amplificação do cDNA, estimar os valores de ciclo limiar (Ct, *thresholdcycle*) e determinar a especificidade da amplificação pela curva de fusão (*melting curve*). As expressões relativas de cada RNAm foram calculadas considerando os valores de $-\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) e as eficiências obtidas pelo *software* LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Como normalizadores foram utilizados Iba1 (molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), conforme análise de estabilidade de expressão feita pelo algoritmo geNorm. Na tabela abaixo estão descritos os *primers* utilizados.

Tabela 1 - Sequências de *primers* utilizados

Gene	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
IFN- γ	ACCATCCTTTTGCCAGTTCC	TCTTCCTCATGGCTGTTTCTG
TNF- α	TGTCTTTGAGATCCATGCCG	AGACCCTCACACTCAGATCA
Iba1	GTCCTTGAAGCGAATGCTGG	CATTCTCAAGATGGCAGATC
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTTC

3.8. Imunofluorescência

O tecido meníngeo armazenado em lâminas foi permeabilizado com solução de PBS (0,1M) adicionado de Triton X-100 (0,4%) por 10 min e em seguida lavado 5x por 3 min com PBS. As lâminas foram bloqueadas com BSA 5% diluída em PBS-Triton por 1h. Após, as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-CD3-FITC (1:500, BD Biosciences) por 48h, seguidas de 5 lavagens de 3 min com PBS. Foram adicionados 30 μL do corante nuclear DAPI e realizada nova sequência de 5 lavagens de 3 min com PBS. Por fim, foram adicionadas duas gotas de meio de montagem, a lamínula foi colocada e a lâmina selada com esmalte nas laterais.

3.9. Cuidados de biossegurança e descarte de materiais e resíduos

Os equipamentos de proteção individual, tais como luvas, máscaras e jalecos, foram utilizados sempre que necessários. O descarte dos materiais perfurocortantes, bem como os cuidados de biossegurança necessários na manipulação animal e de resíduos químicos e biológicos foram realizados conforme as rotinas estabelecidas pela Comissão de Gestão Ambiental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.10. Análise estatística

Para análise dos testes comportamentais, pesos de órgãos linfoides e citometria de fluxo foi utilizado o modelo de Equações de Estimações Generalizadas (GEE) para levar em conta tanto os grupos (controle e nude), quanto o efeito de ninhada (utilização de mais de um animal da mesma ninhada em um grupo) no desfecho (Guimarães & Hirakata, 2012). As expressões relativas de RNAm e do imunoconteúdo das proteínas sinápticas foram comparadas utilizando o teste t de Student. Todos os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As análises foram realizadas com o *software* IBM SPSS Statistics (v.20) e supervisionadas pela Unidade de Bioestatística do HCPA.

4. RESULTADOS

4.1. Locomoção e comportamentos repetitivos/estereotipados

No teste de campo aberto não foram encontradas diferenças na velocidade de deslocamento, distância percorrida, tempo no centro, tempo em descanso e *rearings* entre os grupos (dados não apresentados). Entretanto, o monitor de atividades registrou um aumento significativo nos movimentos instáveis (indicadores de estereotipias) dos animais nude (controle: $2320,90 \pm 88,89$, nude: $3313,91 \pm 242,89$, $p < 0,001$, Figura 5A). A partir disso, observadores treinados realizaram a avaliação de vídeos do período de teste para classificação do comportamento repetitivo de autolimpeza. O grupo nude apresentou elevação em diversos parâmetros, tais como o número de episódios incompletos (controle: $5,59 \pm 0,48$, nude: $8,25 \pm 1,12$, $p < 0,001$, Figura 5B) e totais (controle: $20,68 \pm 0,98$, nude: $22,50 \pm 1,10$, $p < 0,05$, Figura 5B); duração de autolimpeza completa (controle: $283,81 \text{ s} \pm 22,53$, nude: $339,57 \text{ s} \pm 33,02$, $p < 0,05$) e total (controle: $318,08 \text{ s} \pm 22,68$, nude: $389,47 \text{ s} \pm 29,65$, $p < 0,01$); e duração média de episódios completos (controle: $18,92 \text{ s} \pm 1,29$, nude: $24,97 \text{ s} \pm 2,79$, $p < 0,05$).

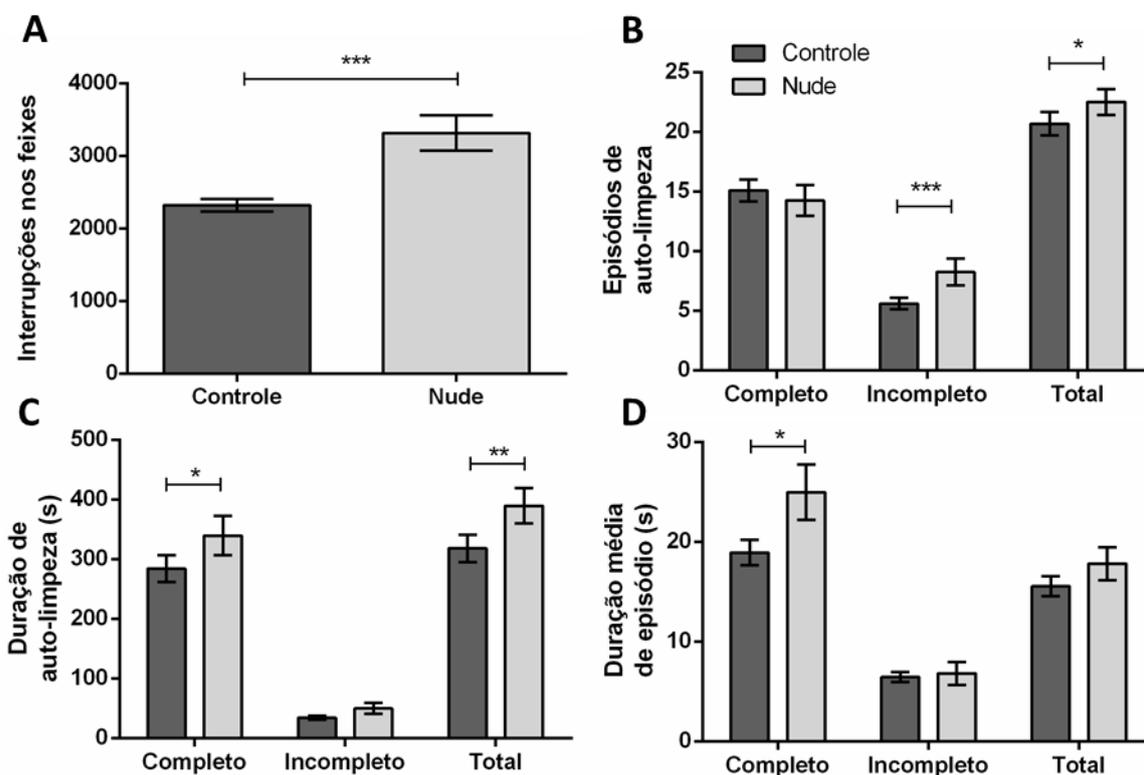


Figura 5 - Alterações no comportamento repetitivo/estereotipado de autolimpeza. (A) Movimentos instáveis quantificados por interrupções nos feixes do monitor de atividade. (B) Número de episódios de autolimpeza avaliados por observação em vídeo. (C) Duração de autolimpeza cronometrada por observação em vídeo. (D) Duração média de cada episódio de autolimpeza calculada pela razão entre a duração e o número de episódios. $n_{\text{controle}} = 20-22$, $n_{\text{nude}} = 11-12$, $n_{\text{ninhadas}} = 11-12$. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

O teste de enterramento de bolinhas (*marble burying test*) foi realizado como avaliação adicional de outro comportamento repetitivo/estereotipado. Curiosamente, animais do grupo nude enterraram menos bolinhas em comparação ao grupo controle, não indicando estereotipias (controle: $35,45\% \pm 4,89$, nude: $5,07\% \pm 2,94$, $p < 0,001$, Figura 6). Dessa forma, camundongos nude apresentaram alterações divergentes em diferentes testes de comportamento repetitivo/estereotipado.

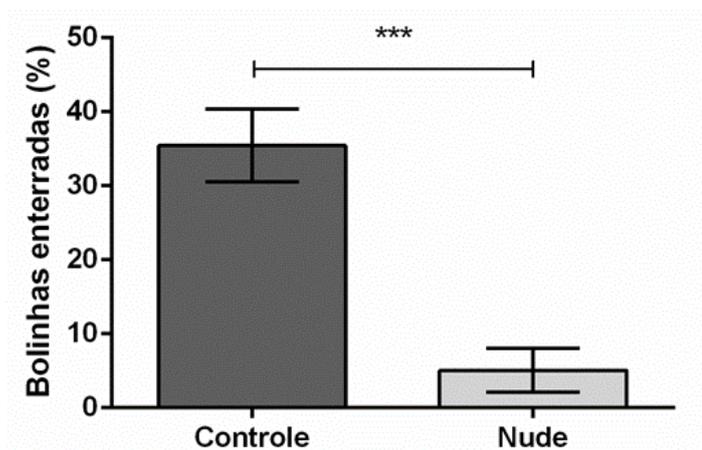


Figura 6 - Alteração no comportamento de enterramento de bolinhas. Grupo nude apresentou redução do comportamento repetitivo de enterramento de bolinhas.

$n_{\text{controle}} = 22$, $n_{\text{nude}} = 12$, $n_{\text{ninhadas}} = 12$. *** $p < 0,001$.

4.2. Resposta à nocicepção térmica

No teste de retirada da cauda (*tail flick test*) camundongos nude apresentaram maior sensibilidade a estímulos nociceptivos térmicos, conforme demonstrado pela menor latência para retirada da cauda (controle: $6,47 \text{ s} \pm 0,31$, nude: $4,99 \pm 0,29$, $p < 0,001$, Figura 7).

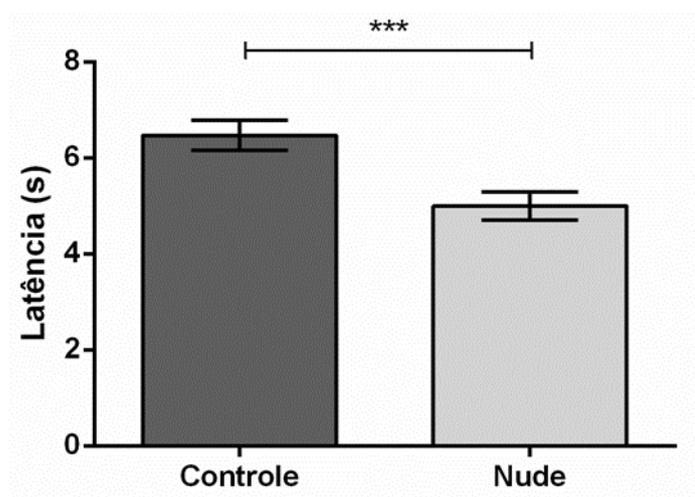


Figura 7 - Limiar de nocicepção térmica. Diminuição da latência para retirada da cauda é observada em camundongos nude. $n_{\text{controle}} = 21$, $n_{\text{nude}} = 11$, $n_{\text{ninhadas}} = 11$.

*** $p < 0,001$.

4.3. Comportamento social

No teste de sociabilidade de 3 câmaras nenhum dos grupos apresentou diferença significativa para o tempo permanecido em cada uma das câmaras (Figura 8A). O grupo controle apresentou maior tempo de investigação do animal desconhecido em comparação ao objeto desconhecido, demonstrando preferência por interação social com coespecífico. Entretanto, tal preferência não foi demonstrada pelo grupo nude, um indicativo de prejuízos sociais (controle_{animal desconhecido}: 170,14 s ± 15,34, controle_{objeto desconhecido}: 101,23 s ± 9,27; nude_{animal desconhecido}: 132,83 ± 31,09, nude_{objeto desconhecido}: 74,50 s ± 20,29; p<0,001, Figura 8B).

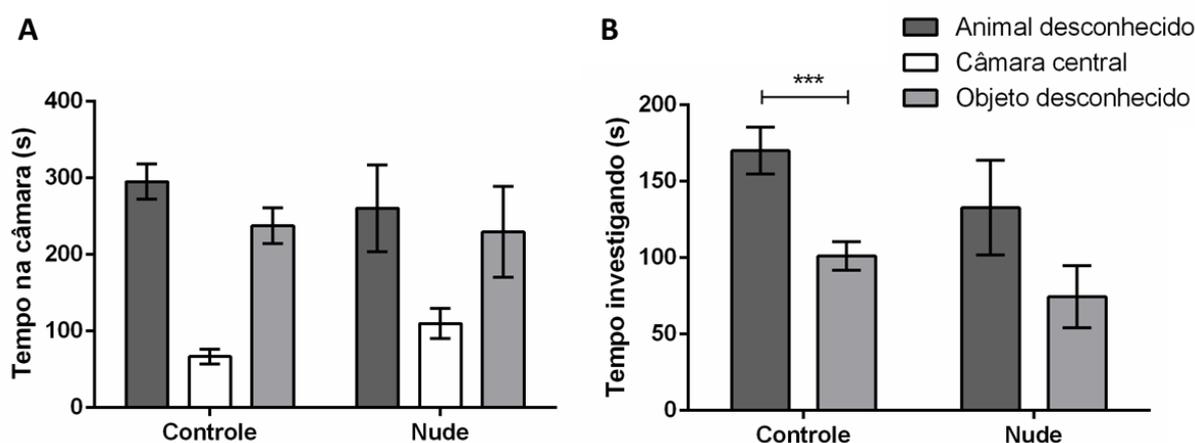


Figura 8 - Alteração no comportamento social. (A) Tempos de permanência em cada câmara. (B) Tempos de investigação do objeto e animal desconhecidos. Animais *nude* não demonstraram preferência por interação social com coespecífico, conforme o grupo controle. $n_{\text{controle}} = 22$, $n_{\text{nude}} = 12$, $n_{\text{ninhas}} = 12$. ***p<0,001.

4.4. Análise de órgãos linfoides e perfil de células T e B

Na idade em que foram eutanasiados (P40) os animais e as estruturas removidas foram pesados. Não houve diferença significativa nos pesos absolutos dos órgãos linfoides entre os grupos (Tabela 2). Entretanto, animais do grupo nude apresentaram um menor peso corporal em comparação aos seus irmãos heterozigotos do grupo controle (controle: 26,03 g ± 0,40, nude: 21,39 g ± 0,67, p<0,001, Tabela 2). Dessa forma, o peso relativo (mg de órgão por g de peso corporal) de cada órgão foi calculado, evidenciando um maior peso relativo no grupo

nude (baço_{controle}: $3,47 \pm 0,06$, baço_{nude}: $4,25 \pm 0,21$, $p < 0,001$; linfonodo_{controle}: $0,08 \pm 0,003$, linfonodo_{nude}: $0,14 \pm 0,02$, $p < 0,01$, Tabela 2).

Tabela 2 - Pesos absolutos e relativos de órgãos linfoides

Parâmetro	Controle	Nude
Peso absoluto		
Corporal (g)	$26,03 \pm 0,40$	$21,39 \pm 0,67^{***}$
Baço (mg)	$90,55 \pm 1,50$	$90,64 \pm 4,57$
Linfonodo (mg)	$2,20 \pm 0,09$	$2,88 \pm 0,42$
Peso relativo (órgão / corporal)		
Baço (mg/g)	$3,47 \pm 0,06$	$4,25 \pm 0,21^{***}$
Linfonodo (mg/g)	$0,08 \pm 0,003$	$0,14 \pm 0,02^{**}$

$n_{\text{controle}} = 17-21$, $n_{\text{nude}} = 11$, $n_{\text{ninhadas}} = 11$. $^{***}p < 0,001$, $^{**}p < 0,01$.

O perfil de linfócitos T e B analisado por citometria de fluxo no baço e no *pool* de linfonodos confirmou a imunodeficiência de células T (CD3+) esperada para camundongos nude (baço_{controle}: $42,41\% \pm 3,10$, baço_{nude}: $6,19\% \pm 1,64$, $p < 0,001$; linfonodo_{controle}: $80,67\% \pm 2,89$, linfonodo_{nude}: $4,80\% \pm 1,13$, $p < 0,001$; Figura 9). Além disso, foi observado um aumento no percentual de células B (CD19+) em ambos os órgãos no grupo nude (baço_{controle}: $41,95\% \pm 3,38$, baço_{nude}: $62,19\% \pm 7,51$, $p < 0,01$; linfonodo_{controle}: $7,10\% \pm 1,61$, linfonodo_{nude}: $51,59\% \pm 9,85$, $p < 0,001$; Figura 9).

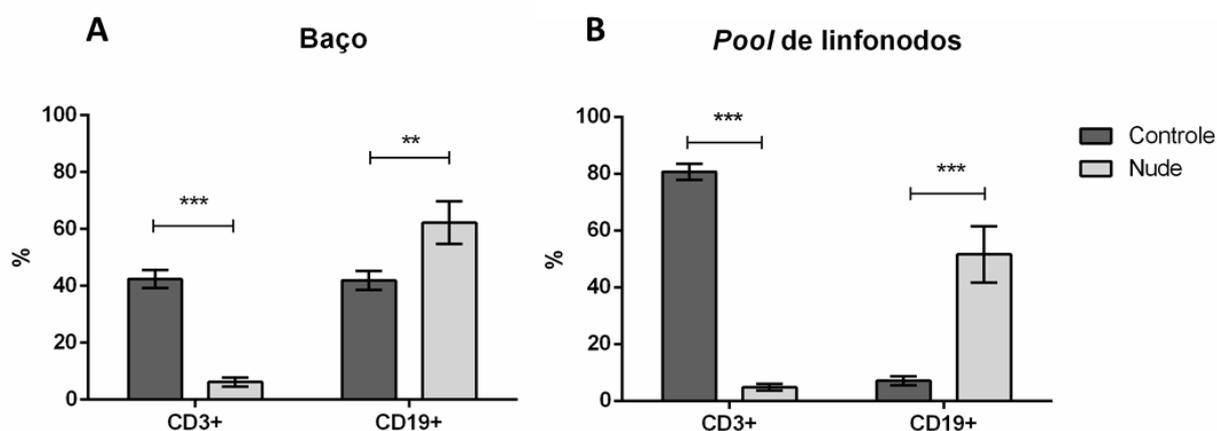


Figura 9 - Quantificação dos percentuais de células T (CD3+) e B (CD19+) em baço e pool de linfonodos. O grupo nude apresentou redução percentual de CD3+ e aumento de CD19+ em (A) baço e (B) pool de linfonodos subcutâneos. $n_{\text{controle}} = 10-11$, $n_{\text{nude}} = 7$, $n_{\text{ninhadas}} = 7$. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

4.5. Imunoconteúdo de proteínas sinápticas

Parâmetros do equilíbrio excitatório/inibitório do córtex pré-frontal, conhecido pela regulação do comportamento social (Yizhar et al., 2011), foram avaliados pela análise do imunoconteúdo de proteínas sinápticas. Foi observada uma redução da proteína de ancoramento PSD-95, presente no terminal pós-sináptico de sinapses excitatórias, no grupo nude (controle: $1,48 \pm 0,03$, nude: $1,02 \pm 0,15$, $p < 0,05$, Figura 10). Não houve diferença significativa no conteúdo de sinaptofisina (presente em vesículas sinápticas) e gefirina (ancoramento de sinapses inibitórias).

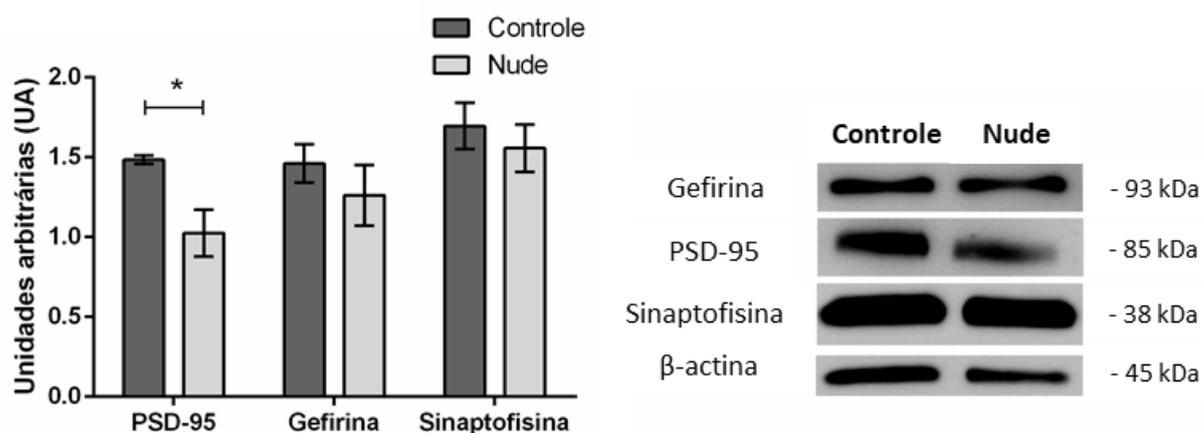


Figura 10 - Imunoconteúdo de proteínas sinápticas. Animais nude apresentaram uma redução no imunoconteúdo da proteína PSD-95 no córtex pré-frontal. $n_{\text{controle}} = 6$, $n_{\text{nude}} = 6$, $n_{\text{ninhadas}} = 6$. * $p < 0,05$.

4.6. Expressão gênica

Foram avaliadas as expressões gênicas relativas das citocinas IFN- γ e TNF- α , envolvidas com alterações no comportamento social (Filiano et al., 2016) e repetitivo/estereotipado (Fiore et al., 1996), respectivamente. Foi observada uma redução de IFN- γ no córtex pré-frontal de camundongos do grupo nude (controle: $1,26 \pm 0,33$, nude: $0,47 \pm 0,10$, $p < 0,05$, Figura 11). Não foi encontrada diferença nos níveis da citocina TNF- α .

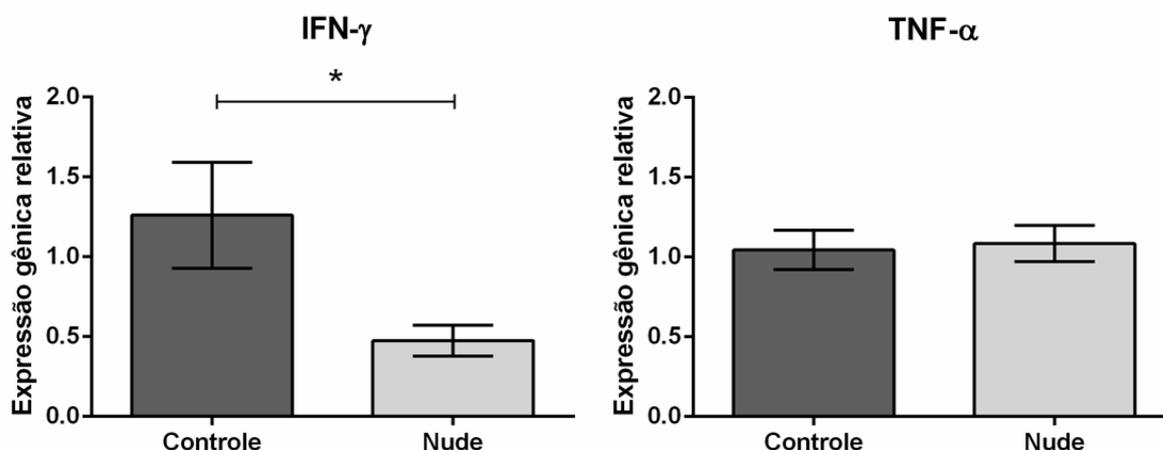


Figura 11 - Expressão gênica relativa de IFN- γ e TNF- α . Redução da expressão gênica relativa da citocina IFN- γ no córtex pré-frontal de animais nude. $n_{\text{controle}} = 7$, $n_{\text{nude}} = 8$, $n_{\text{ninhadas}} = 8$. * $p < 0,05$.

4.7. Células T meníngeas

A presença de células T nas meninges de roedores vem sendo relacionada à modulação de comportamentos sociais (Filiano et al., 2016), cognição e memória (Derecki et al., 2010). Recentemente foi demonstrado o papel crucial do IFN- γ secretado por células T meníngeas para o controle do equilíbrio excitatório/inibitório cortical e comportamento social (Filiano et al., 2016). Considerando a imunodeficiência de células T característica dos animais nude, o prejuízo social (Figura 8) e a redução na expressão gênica de IFN- γ no córtex pré-frontal (figura 8) demonstrados nesse trabalho, avaliamos por imunofluorescência, em um estudo piloto, a presença de células T CD3+ nos grupos controle e nude (Figura 12). Podemos observar no animal do grupo controle a presença de células T CD3+ (verde) co-localizadas com o corante nuclear DAPI (azul) na área do seio superior sagital do tecido meníngeo, local de concentração desse tipo de célula (Louveau, Smirnov, et al., 2015). De forma inédita, demonstramos que o grupo nude não apresenta marcação para células T CD3+ no tecido meníngeo.

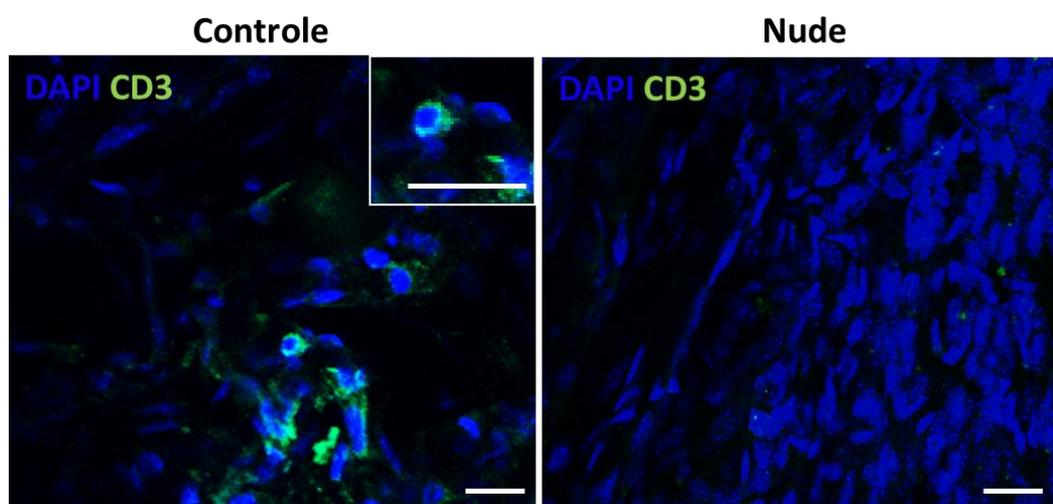


Figura 12 - Células T CD3+ nas meninges. Imagens representativas da marcação imunofluorescente de células T CD3+ (em verde) na região do seio superior sagital de meninges de animais dos grupos controle e nude. Pode-se observar a ausência de marcação positiva no animal nude. Aumento: 40x. Barra de escala: 25 μ m.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho realizamos diversos testes comportamentais considerados importantes no estudo de transtornos neuropsiquiátricos e do neurodesenvolvimento, buscando avaliar o impacto da imunodeficiência de células T sobre eles. Foram utilizados camundongos BALB/c *nude* cujos níveis baixos de células T nos animais homocigotos sem timo foram confirmados por citometria de fluxo, sendo a população de células B o predominante componente linfocitário. O peso relativo dos órgãos linfoides desses animais se encontrara alterado, possivelmente devido ao menor peso corporal, característica dos homocigotos (Vidal, 1996), em relação aos heterocigotos do grupo controle.

Iniciamos a bateria de testes comportamentais pelo teste de campo aberto, pois é um teste essencial para avaliar padrões exploratórios e locomotores básicos entre os grupos. Não foram encontradas diferenças na velocidade de deslocamento, distância percorrida, tempo no centro, tempo em descanso e *rearings*. Esse resultado é importante para a interpretação de outros testes comportamentais (e.g., o teste de sociabilidade de 3 câmaras), pois descarta a interferência de alterações motoras nos resultados encontrados.

Entretanto, foi encontrado um aumento de movimentos instáveis no grupo *nude*. Os movimentos instáveis são medidos pelo monitor de atividades como interrupções repetitivas nos feixes de luz infravermelha que cruzam o aparato sem que haja o deslocamento do centro de massa do animal. Baseados nessa indicação de estereotipias, fizemos a análise em vídeo para classificação do comportamento repetitivo de autolimpeza dos animais, no qual foram encontradas elevações em múltiplos parâmetros no grupo *nude*. A princípio, o aumento no número de episódios de comportamentos de autolimpeza incompletos e totais e o aumento na duração de autolimpezas completas e totais poderiam ser considerados como manifestações de comportamentos repetitivos/estereotipados (Kalueff et al., 2007; Wöhr & Scattoni, 2013). Porém, tais resultados devem ser interpretados com cautela. Não podemos descartar que, devido à ausência de pelos, os animais *nude* possam apresentar um padrão de autolimpeza diferenciado. De fato, quando avaliado o comportamento repetitivo/estereotipado pelo teste de enterramento de bolinhas, o grupo *nude* demonstrou uma taxa reduzida de enterramento em comparação ao grupo controle.

Divergentemente, camundongos com imunodeficiência de células T e B (RAG -/-) apresentam um maior número de bolinhas enterradas no teste, além de aumento no comportamento de escavação (*digging*), os quais são indicativos de estereotípias (Rattazzi et al., 2013). A redução do imunoconteúdo de PSD-95 encontrada no córtex pré-frontal de camundongos nude poderia estar correlacionada com os resultados encontrados, visto que camundongos com deleção do gene codificante dessa proteína apresentam tanto aumento do comportamento de autolimpeza quanto redução do comportamento de enterramento de bolinhas (Feyder et al., 2010).

A avaliação da resposta à nocicepção térmica realizada pelo teste de retirada da cauda revelou uma maior sensibilidade nos animais nude, representada pela menor latência para retirada da cauda. Resultados similares já foram demonstrados em uma linhagem imunodeficiente semelhante (NMRI nu/nu), na qual foi encontrada maior sensibilidade térmica no teste de placa quente (Vermeirsch & Meert, 2004). A resposta basal à nocicepção de origem mecânica não parece estar alterada em camundongos imunodeficientes nude, entretanto é apresentada hiperalgesia quando imunizados com ovoalbumina (Boué et al., 2011). A ausência de células T afeta também a nocicepção visceral, conforme observada pela hiperalgesia visceral presente em camundongos gravemente imunodeficientes (BALB/c SCID), a qual pode ser revertida com o repovoamento de células T CD4⁺ (Verma-Gandhu et al., 2006).

O comportamento social dos animais foi analisado através do teste de sociabilidade de 3 câmaras, no qual a preferência de interação com um objeto desconhecido ou um animal desconhecido é comparada dentro do grupo experimental. Os animais do grupo controle apresentaram uma diferença estatisticamente significativa entre o tempo de investigação do objeto e do animal, passando mais tempo interagindo com o animal – um comportamento típico de roedores (Crawley, 2007) – embora o tempo permanecido nas câmaras não tenha sido diferente. No grupo nude, apesar do tempo de interação com o animal desconhecido também ter sido maior, não houve diferença estatisticamente significativa, indicando possíveis prejuízos sociais nesses animais. Diversos transtornos neuropsiquiátricos e do neurodesenvolvimento são caracterizados por prejuízos no comportamento social e envolvimento do sistema imunológico, como

esquizofrenia, depressão e principalmente transtorno do espectro autista (Coyle, 2011; Kaidanovich-Beilin et al., 2011). O transtorno do espectro autista é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino do que feminino (Gottfried et al., 2015) e, de maneira semelhante, roedores fêmeas do modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico não exibem os prejuízos sociais presentes em machos (Schneider et al., 2008). Interessantemente, redução da interação social com um coespecífico no teste de sociabilidade recíproca (realizado com os dois animais livres em um aparato de campo aberto) foi demonstrada apenas em camundongos imunodeficientes nude machos, enquanto fêmeas possuem sociabilidade normal (Vidal, 1996).

A expressão do comportamento social é extremamente dependente do equilíbrio excitatório/inibitório cortical, principalmente do córtex frontal, visto que o predomínio de excitação nessa região já foi demonstrada como fator causal de déficits na sociabilidade em animais (Yizhar et al., 2011). Dessa forma, buscamos avaliar parâmetros de excitação/inibição no córtex pré-frontal através do imunoconteúdo de proteínas sinápticas presentes em terminais pré-sinápticos (sinaptofisina), pós-sinápticos excitatórios (PSD-95) e pós-sinápticos inibitórios (gefirina). Conforme mencionado anteriormente, nossos resultados revelaram uma diminuição do imunoconteúdo de PSD-95 em animais nude, indicando uma redução do componente excitatório, o que desafia a hipótese inicial de prejuízos sociais correlacionados com predomínio da excitação. Anormalidades em componentes excitatórios já foram descritas em camundongos nude, tais como redução nos níveis basais de glutamato (principal neurotransmissor excitatório no SNC) no córtex e maior susceptibilidade aos efeitos deletérios de convulsões induzidas por pilocarpina (Vignoli et al., 2012).

Recentemente, um novo mecanismo relacionando o equilíbrio excitatório/inibitório cortical e células T foi descrito em estudos com animais severamente imunodeficientes (SCID) (Filiano et al., 2016). Camundongos SCID apresentam hiperconectividade entre múltiplas regiões do córtex frontal e prejuízos sociais. A análise do transcriptoma celular e encefálico, em resposta à citocinas secretadas por células T, revelou uma forte interação entre o comportamento social e respostas dependentes de IFN- γ . O bloqueio da migração de células T para as meninges ou *nocaut* dos genes de IFN- γ ou do receptor de IFN- γ produzem os

mesmos déficits sociais e hiperconectividade observados inicialmente. Foi demonstrado que a manutenção do comportamento social pelas células T meníngicas ocorre pela secreção de IFN- γ , o qual atua em receptores IFN- γ R1 de interneurônios no córtex pré-frontal, aumentando a inibição tônica GABAérgica e prevenindo a hiperexcitabilidade cortical. Baseados nessa recente descoberta, realizamos a análise da expressão gênica de IFN- γ e TNF- α – que assim como IFN- γ é uma citocina derivada de uma resposta Th1 e que está envolvida na progressão de doenças neurológicas (Benveniste & Benos, 1995) e presença de estereotipias (Fiore et al., 1996) – no córtex pré-frontal dos grupos controle e nude. Dessa forma, encontramos uma redução da expressão gênica de IFN- γ nos animais nude, enquanto os níveis de TNF- α permaneceram inalterados.

Apesar da análise por citometria de fluxo ter demonstrado a ausência quase total de células T nos camundongos nude desse trabalho, nos pareceu necessária a confirmação da ausência dessas células nas meninges dos animais, para assim relacionarmos imunodeficiência, redução da expressão gênica de IFN- γ no córtex pré-frontal e os prejuízos sociais encontrados. Como avaliação inicial na forma de piloto, observamos por marcação imunofluorescente a presença de células T CD3+ na área do seio superior sagital do tecido meníngeo de um animal controle e um animal nude. Células T CD3+ foram encontradas apenas no animal controle, de acordo com o esperado. Para confirmação desse resultado ainda será necessário um aumento do número experimental e quantificação de células/área, além de uma imunomarcação adicional para células de vasos linfáticos para assegurar que as células T não estão contidas no endotélio vascular.

Em resumo, animais homozigotos nude possuem um padrão complexo de alterações comportamentais em diferentes domínios, além de redução de uma proteína sináptica excitatória e diminuição dos níveis moleculares de uma importante citocina moduladora do comportamento social. Os testes de comportamentos repetitivos/estereotipados apresentaram resultados contraditórios, entretanto, a mesma incoerência pode ser encontrada em animais com deleção do gene da PSD-95 (Feyder et al., 2010). A maior sensibilidade à nocicepção térmica está de acordo com observações semelhantes realizadas com outras metodologias (Verma-Gandhu et al., 2006; Vermeirsch & Meert, 2004) e fortalece o papel da imunidade celular na modulação da nocicepção (Ren & Dubner, 2010), embora não tenhamos avaliado se

essa influência acontece em nível central ou periférico. O prejuízo social encontrado no grupo nude está de acordo com as recentes demonstrações do papel central das células T para o comportamento social (Filiano et al., 2017). Nossos resultados demonstram que esses animais possuem uma redução da expressão gênica de IFN- γ no córtex pré-frontal e uma potencial ausência de células T secretoras de IFN- γ nas meninges, o que poderia estar correlacionado com os déficits sociais encontrados (Filiano et al., 2016). A redução do imunoconteúdo de PSD-95 no córtex pré-frontal não parece estar de acordo com as observações de prejuízos sociais causados por hiperexcitabilidade (Yizhar et al., 2011), sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na alteração encontrada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Considerando o crescente número de evidências do envolvimento de componentes do sistema imunológico nos principais transtornos que acometem o sistema nervoso central, é imprescindível a busca de novos métodos e ferramentas que contemplem a interface entre esses dois sistemas. No presente trabalho, investigamos na linhagem BALB/c *nude* as consequências da imunodeficiência congênita de células T em diferentes comportamentos relevantes para o estudo de transtornos neuropsiquiátricos e do neurodesenvolvimento e quais os possíveis mecanismos sinápticos e moduladores neuroimunológicos estariam contribuindo para as alterações observadas.

A avaliação dos órgãos linfoides confirmou a esperada imunodeficiência de células T no grupo *nude*, além do maior peso relativo desses órgãos, devido ao menor peso corporal desses animais. Apesar da caracterização comportamental dos animais homocigotos *nude* ter sido realizada em diversos domínios, ainda permanecem dúvidas, em especial sobre a origem do aumento de comportamento de autolimpeza observado. Além disso, testes comportamentais para avaliação de ansiedade (labirinto em cruz-elevado, claro/escuro) e memória (reconhecimento de objetos, esquivas inibitórias) poderiam revelar o envolvimento da imunodeficiência de células T com outras estruturas encefálicas relevantes, como a amígdala e o hipocampo. Adicionalmente, se faz necessária também a avaliação de parâmetros de ansiedade e possíveis deficiências olfatórias para o descarte da interferência desses fatores na exploração social dos roedores.

Os mecanismos envolvendo a ausência de células T, o componente estrutural sináptico do equilíbrio excitatório/inibitório e o prejuízo social nesses animais ainda precisam ser completamente elucidados. Apenas com estudos eletrofisiológicos poderemos compreender o verdadeiro significado da redução do imunoconteúdo de PSD-95 e se a redução de IFN- γ é o fator causal e preponderante para a alteração do comportamento social observada no grupo *nude*.

Concluindo, a linhagem BALB/c *nude* oferece potencial para o estudo de interações neuroimunológicas, principalmente ao considerarmos as dificuldades de obtenção e manutenção de linhagens transgênicas mais específicas. Como

perspectivas interessantes podemos destacar a análise de outras citocinas (baseadas em resposta Th1/Th2/Th17) presentes nas meninges ou no córtex, além do repovoamento do sistema imunológico dos animais com diferentes subpopulações de células T CD4+ e seu impacto nos diferentes comportamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baronio, D., Castro, K., Gonchoroski, T., de Melo, G. M., Nunes, G. D. F., Bambini-Junior, V., Gottfried, C., & Riesgo, R. (2015). Effects of an H3R antagonist on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *PLoS one*, *10*(1), e0116363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116363>
- Benveniste, E. N., & Benos, D. J. (1995). TNF-alpha- and IFN-gamma-mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *9*(15), 1577–84. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529837>
- Boehm, T., Nehls, M., & Kyewski, B. (1995). Transcription factors that control development of the thymic microenvironment. *Immunology Today*, *16*(12), 555–556. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80074-3](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80074-3)
- Boué, J., Blanpied, C., Brousset, P., Vergnolle, N., & Dietrich, G. (2011). Endogenous opioid-mediated analgesia is dependent on adaptive T cell response in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(9), 5078–84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003335>
- Bristot Silvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes- Santos, A., Torres Abib, R., Zanotto, C., Batassini, C., Brolese, G., Gonçalves, C. A., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2013). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Research*, *1495*, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.11.048>
- Cheers, C., & Waller, R. (1975). Activated macrophages in congenitally athymic “nude mice” and in lethally irradiate mice. *Journal of Immunology*, *115*(3), 844–847. Recuperado de [papers3://publication/uuid/19314ADE-9EBF-456F-BF4D-6721E4DEA1CA](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19314ADE-9EBF-456F-BF4D-6721E4DEA1CA)
- Coyle, P. K. (2011). Dissecting the Immune Component of Neurologic Disorders: A Grand Challenge for the 21st Century. *Frontiers in Neurology*, *2*, 37. <https://doi.org/10.3389/fneur.2011.00037>

- Crawley, J. N. (2007). Mouse Behavioral Assays Relevant to the Symptoms of Autism. *Brain Pathology*, 17(4), 448–459. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x>
- Derecki, N. C., Cardani, A. N., Yang, C. H., Quinlivan, K. M., Cirielli, A., Lynch, K. R., & Kipnis, J. (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *The Journal of experimental medicine*, 207(5), 1067–80. <https://doi.org/10.1084/jem.20091419>
- Diamond, M. C., Rainbolt, R. D., Guzman, R., Greer, E. R., & Teitelbaum, S. (1986). Regional cerebral cortical deficits in the immune-deficient nude mouse: a preliminary study. *Experimental neurology*, 92(2), 311–22. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3956664>
- Feyder, M., Karlsson, R.-M., Mathur, P., Lyman, M., Bock, R., Momenan, R., Munasinghe, J., Scattoni, M. L., Ihne, J., Camp, M., Graybeal, C., Strathdee, D., Begg, A., Alvarez, V. A., Kirsch, P., Rietschel, M., Cichon, S., Walter, H., Meyer-Lindenberg, A., Grant, S. G. N., & Holmes, A. (2010). Association of Mouse *Dlg4* (PSD-95) Gene Deletion and Human *DLG4* Gene Variation With Phenotypes Relevant to Autism Spectrum Disorders and Williams' Syndrome. *American Journal of Psychiatry*, 167(12), 1508–1517. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10040484>
- Filiano, A. J., Gadani, S. P., & Kipnis, J. (2015). Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain research*, 1617, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.07.050>
- Filiano, A. J., Gadani, S. P., & Kipnis, J. (2017). How and why do T cells and their derived cytokines affect the injured and healthy brain? *Nature Reviews Neuroscience*, 18(6), 375–384. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.39>
- Filiano, A. J., Xu, Y., Tustison, N. J., Marsh, R. L., Baker, W., Smirnov, I., Overall, C. C., Gadani, S. P., Turner, S. D., Weng, Z., Peerzade, S. N., Chen, H., Lee, K. S., Scott, M. M., Beenhakker, M. P., Litvak, V., & Kipnis, J. (2016). Unexpected role of interferon- γ in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature*, 535(7612), 425–429. <https://doi.org/10.1038/nature18626>
- Fiore, M., Probert, L., Kollias, G., Akassoglou, K., Alleva, E., & Aloisi, L. (1996).

- Neurobehavioral Alterations in Developing Transgenic Mice Expressing TNF- α in the Brain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 10(2), 126–138. <https://doi.org/10.1006/brbi.1996.0013>
- Gaufo, G. O., & Diamond, M. C. (1997). Thymus graft reverses morphological deficits in dorsolateral frontal cortex of congenitally athymic nude mice. *Brain research*, 756(1–2), 191–9. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187332>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., & Savino, W. (2015). The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in psychiatry*, 6, 121. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00121>
- Guimarães, L. S. P., & Hirakata, V. N. (2012). Uso de modela de equações de estimativas generalizadas na análise de dados longitudinais. *Revista HCPA*, 32(4), 503–511. Recuperado de <http://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/36971>
- Hasui, M., Saikawa, Y., Miura, M., Takano, N., Ueno, Y., Yachie, A., Miyawaki, T., & Taniguchi, N. (1989). Effector and precursor phenotypes of lymphokine-activated killer cells in mice with severe combined immunodeficiency (scid) and athymic (nude) mice. *Cellular Immunology*, 120(1), 230–239. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(89\)90190-1](https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90190-1)
- Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J., & Woodgett, J. R. (2011). Assessment of social interaction behaviors. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (48). <https://doi.org/10.3791/2473>
- Kalueff, A. V., Wayne Aldridge, J., Laporte, J. L., Murphy, D. L., & Tuohimaa, P. (2007). Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nature Protocols*, 2(10), 2538–2544. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.367>
- Kierszembau, A. L. (2004). *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia* (1º ed). Rio de Janeiro, RJ: Elsevier.

- Kim, S.-J., Lee, H., Lee, G., Oh, S.-J., Shin, M.-K., Shim, I., & Bae, H. (2012). CD4+CD25+ regulatory T cell depletion modulates anxiety and depression-like behaviors in mice. *PloS one*, 7(7), e42054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042054>
- Kipnis, J. (2016). Multifaceted interactions between adaptive immunity and the central nervous system. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aag2638>
- Kipps, T. J. (2010). Chapter 5. The Organization and Structure of Lymphoid Tissues. In M. A. Lichtman, T. J. Kipps, U. Seligsohn, K. Kaushansky, & J. T. Prchal (Orgs.), *Williams Hematology, 8e*. New York, NY: The McGraw-Hill Companies. Recuperado de <http://mhmedical.com/content.aspx?aid=6115884>
- Liu, J., Ma, Y., Tian, S., Zhang, L., Zhao, M., Zhang, Y., & Xu, D. (2014). T cells promote the regeneration of neural precursor cells in the hippocampus of Alzheimer's disease mice. *Neural regeneration research*, 9(16), 1541–7. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.139481>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Louveau, A., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in immunology*, 36(10), 569–77. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.006>
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523(7560), 337–41. <https://doi.org/10.1038/nature14432>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–75. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- Morton, C. L., & Houghton, P. J. (2007). Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nature protocols*, 2(2), 247–50. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.25>

- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Onore, C., Careaga, M., & Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, behavior, and immunity*, *26*(3), 383–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.007>
- Palacios, R., & Samaridis, J. (1991). Rearrangement patterns of T-cell receptor genes in the spleen of athymic (nu/nu) young mice. *Immunogenetics*, *33*(2), 90–95. <https://doi.org/10.1007/BF00210820>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, *357*(9270), 1777–89. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Pasternak, O., Kubicki, M., & Shenton, M. E. (2015). In vivo imaging of neuroinflammation in schizophrenia. *Schizophrenia research*. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.05.034>
- Quinnies, K. M., Cox, K. H., & Rissman, E. F. (2015). Immune deficiency influences juvenile social behavior and maternal behavior. *Behavioral Neuroscience*, *129*(3), 331–338. <https://doi.org/10.1037/bne0000053>
- Radjavi, A., Smirnov, I., Derecki, N., & Kipnis, J. (2014). Dynamics of the meningeal CD4(+) T-cell repertoire are defined by the cervical lymph nodes and facilitate cognitive task performance in mice. *Molecular psychiatry*, *19*(5), 531–3. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.79>
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Lekanne Deprez, R. H., & Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, *339*(1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)
- Rattazzi, L., Piras, G., Ono, M., Deacon, R., Pariante, C. M., & D'Acquisto, F. (2013). CD4⁺ but not CD8⁺ T cells revert the impaired emotional behavior of immunocompromised RAG-1-deficient mice. *Translational psychiatry*, *3*(7), e280. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.54>

- Ren, K., & Dubner, R. (2010). Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nature medicine*, *16*(11), 1267–76. <https://doi.org/10.1038/nm.2234>
- Réus, G. Z., Fries, G. R., Stertz, L., Badawy, M., Passos, I. C., Barichello, T., Kapczinski, F., & Quevedo, J. (2015). The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*, *300*, 141–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.018>
- Romano, R., Palamaro, L., Fusco, A., Iannace, L., Maio, S., Vigliano, I., Giardino, G., & Pignata, C. (2012). From murine to human nude/SCID: the thymus, T-cell development and the missing link. *Clinical & developmental immunology*, *2012*, 467101. <https://doi.org/10.1155/2012/467101>
- Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *30*, 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewłocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(6), 728–740. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011>
- Varley, J., Brooks, D. J., & Edison, P. (2015). Imaging neuroinflammation in Alzheimer's disease and other dementias: Recent advances and future directions. *Alzheimer's & Dementia*, *11*(9), 1110–1120. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.08.105>
- Verma-Gandhu, M., Bercik, P., Motomura, Y., Verdu, E. F., Khan, W. I., Blennerhassett, P. A., Wang, L., El-Sharkawy, R. T., Collins, S. M., Bigliardi, P. L., Sumanovski, L. T., Buchner, S., Ruffli, T., Bigliardi-Qi, M., Tracey, K. J., McHugh, K. J., Collins, S. M., Weingarten, H. P., Julius, D., Basbaum, A. I., ... Matin, K. (2006). CD4+ T-cell modulation of visceral nociception in mice. *Gastroenterology*, *130*(6), 1721–8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.045>
- Vermeirsch, H., & Meert, T. F. (2004). Morphine-induced analgesia in the hot-plate

- test: comparison between NMRI(nu/nu) and NMRI mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 94(2), 59–64. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748848>
- Vidal, J. (1996). Differences of nu/+ and nu/nu mice in some behaviors reflecting temperament traits. *Physiology & behavior*, 59(2), 341–8. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8838614>
- Vignoli, T., Nehlig, A., Massironi, S. G., Coimbra, R. de C. S., Mazzacoratti, M. da G. N., Silva, I. R., Neto, E. F. de C., Persike, D. S., & Fernandes, M. J. da S. (2012). Consequences of pilocarpine-induced status epilepticus in immunodeficient mice. *Brain research*, 1450, 125–37. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.028>
- Widner, H., & Brundin, P. (1988). Immunological aspects of grafting in the mammalian central nervous system. A review and speculative synthesis. *Brain Research Reviews*, 13(3), 287–324. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(88\)90010-0](https://doi.org/10.1016/0165-0173(88)90010-0)
- Win-Shwe, T.-T., Tsukahara, S., Ahmed, S., Fukushima, A., Yamamoto, S., Kakeyama, M., Nakajima, D., Goto, S., Kobayashi, T., & Fujimaki, H. (2007). Athymic nude mice are insensitive to low-level toluene-induced up-regulation of memory-related gene expressions in the hippocampus. *Neurotoxicology*, 28(5), 957–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.08.002>
- Wlodarski, K., Morrison, K., & Rose, N. R. (1982). Effects of nu gene on the numbers of mast cells in lymph nodes. *Scandinavian journal of immunology*, 15(1), 105–8. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7071521>
- Wöhr, M., & Scattoni, M. L. (2013). Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: Current standards and new developments. *Behavioural Brain Research*, 251, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.047>
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T. J., O’Shea, D. J., Sohal, V. S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J. T., Stehfest, K., Fudim, R., Ramakrishnan, C., Huguenard, J. R., Hegemann, P., & Deisseroth, K. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social

dysfunction. *Nature*, 477(7363), 171–8. <https://doi.org/10.1038/nature10360>

Yonk, L. J., Warren, R. P., Burger, R. a, Cole, P., Odell, J. D., Warren, W. L., White, E., & Singh, V. K. (1990). CD4+ helper T cell depression in autism. *Immunology letters*, 25(4), 341–345. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(90\)90205-5](https://doi.org/10.1016/0165-2478(90)90205-5)

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., & Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature neuroscience*, 9(2), 268–75. <https://doi.org/10.1038/nn1629>

ANEXOS**ANEXO 1 - Cartas de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 160174
Data da Versão do Projeto: 23/05/2016

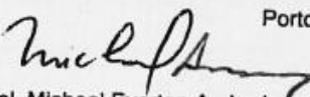
Pesquisadores:
RUDIMAR DOS SANTOS RIESGO
IOHANNA DECKMANN
GUILHERME BAUER NEGRINI
GUSTAVO BRUM SCHWINGEL
CARMEM GOTTFRIED
VICTORIO BAMBINI JUNIOR

Título: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DE PARÂMETROS SINÁPTICOS DE EXCITAÇÃO/INIBIÇÃO E REATIVIDADE MICROGLIAL EM LINHAGEM DE CAMUNDONGO IMUNODEFICIENTE NUDE

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 27 de maio de 2016.



Biol. Michael Everton Andrades
Coordenador CEUA/HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 160174

Pesquisador Responsável

RUDIMAR DOS SANTOS RIESGO

Título: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DE PARÂMETROS SINÁPTICOS DE EXCITAÇÃO/INIBIÇÃO E REATIVIDADE MICROGLIAL EM LINHAGEM DE CAMUNDONGO IMUNODEFICIENTE NUDE

ADENDO AO PROJETO
NOVA VERSÃO DO PROJETO

Data da Versão:

20/07/2016

20/07/2016

Este documento referente ao projeto acima foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 27 de julho de 2016.


 Biol. Michael Everton Andrades
 Coordenador CEUA/HCPA