

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE
FOSFODIESTERASE-5 SOBRE AS CÉLULAS GLIAIS E A RE-
MIELINIZAÇÃO, EM MODELO DE DESMIELINIZAÇÃO
INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 *WILD TYPE* E
KONCKOUT PARA *iNOS***

ANA KAROLINA DE SANTANA NUNES

**Recife
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5
SOBRE AS CÉLULAS GLIAIS E A RE-MIELINIZAÇÃO, EM MODELO DE
DESMIELINIZAÇÃO INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 WILD
TYPE E KONCKOUT PARA iNOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Biologia Química para a Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aluna: Ana Karolina de Santana Nunes

Orientadora: Christina Alves Peixoto

Co-Orientadora: Catarina Raposo Dias Carneiro

Recife
2012

Nunes, Ana Karolina de Santana

Avaliação dos efeitos do inibidor de fosfodiesterase-5 sobre as células gliais e a remielinização induzido em camundongos C57BL/6 *Wild Type* e Konckout para iNOS/ Ana Karolina de Santana Nunes– Recife: O Autor, 2012.

69 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Christina Alves Peixoto

Coorientadora: Catarina Raposo Dias Carneiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia Química para a Saúde, 2012.

Inclui bibliografia

1. Cérebro 2. Sildenafil 3. Óxido nítrico I. Título.

612.82

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-138

Ana Karolina de Santana Nunes

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 SOBRE AS CÉLULAS GLIAIS E A REMIELINIZAÇÃO, EM MODELO DE DESMIELINIZAÇÃO INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 *WILD TYPE* E *KONCKOUT* PARA iNOS

Apresentada no dia 10/02/2012, no CPqAM/FIOCRUZ, às 9:00h.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Silvia Regina Moraes
Departamento de Anatomia- UFPE

Dra. Catarina Rapôso Dias Carneiro
Depto. de Histologia e Embriologia - Instituto de Biologia - UNICAMP

Dra. Christina Alves Peixoto
Laboratório de Ultraestrutura – CPqAM/FIOCRUZ
(Orientadora)

*Dedico este trabalho aos meus pais José João e
Cleide de Santana, que ensinaram a lutar por meus objetivos;
À minha avó Maria Gomes, que mostrou o quanto é importante a fé e
Ao meu marido, Emerson Bernardo, pelo amor e todo apoio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao autor da vida, o único merecedor de glória e honra – Deus, pela sua infinita graça e fidelidade em cumprir suas promessas em minha vida. Pela força, sabedoria e percepção para notar que tudo vem dEle. Não tenho palavras pra agradecer tamanha bondade!

Agradeço à minha Orientadora, Dr^a Christina Peixoto, pela oportunidade, apoio, confiança e amizade, a qual passei a admirar e me espelhar como profissional.

Agradeço à minha Co-orientadora, Dr^a Catarina Raposo, pela confiança, amizade, apoio nos longos momentos de trabalhos. Pela força, paciência e momentos de alegria durante nossas discussões e viagens.

Agradeço especialmente ao meu marido Emerson Bernardo pelo seu amor que hoje me faz mais feliz, pela paciência nos momentos de altas horas nas madrugadas em que deixava de dormir para estudar e companheirismo se fazendo sempre presente em minha vida.

Agradeço à minha família pelo amor e carinho, meus pais, José João e Cleide, pela confiança e ajuda sem limites. A minha irmã Sueida pela amizade absoluta, meu cunhado Robson por completar essa família dando mais felicidade e a minha sobrinha Gabriela que com seu sorriso encantador me trouxe muitas alegrias.

Agradeço à Dr^a Maria Alice, pela oportunidade em realizar experimentos junto ao seu laboratório na UNICAMP nesses últimos meses e por todo apoio dado ao nosso grupo de pesquisa.

Agradeço também a Rayana (Ray) que se integrou nessa equipe executando e interpretando os experimentos, além da força e momentos de alegria no laboratório.

Agradeço a Josy, Ceça e Gaby pelo apoio técnico e efetivo nos experimentos, além de palavras de força e incentivo.

A toda equipe do laboratório de Ultra-estrutura, em especial a Amanda, Karla, Sura e Fabi, pelas palavras positivas, apoio e companheirismo nos trabalhos.

A equipe do Biotério Experimental - CPqAM e ao Biotério Experimental da Farmacologia-UNICAMP, em especial a Denise por todo apoio e atenção durante os experimentos.

]Aos Amigos: Pr. Demétrius, Aurea, Vanessa e Charlenny que contribuíram com suas orações intercessoras, apoio e palavras de fé.

Ao Programa de Pós- graduação em Ciências Biológicas.

Ao CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro.

RESUMO

O Sildenafil (Viagra®) promove acúmulo de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) através da inibição seletiva da fosfodiesterase-5 (PDE5). Embora esse medicamento mantenha um excelente nível de segurança e perfil de tolerabilidade, apenas disfunção erétil e, mais recentemente, hipertensão pulmonar são doenças tratadas atualmente com Sildenafil. Astrócitos e micróglia são células do SNC que exercem um papel importante em numerosas patologias do cérebro, incluindo a Esclerose Múltipla (EM). A EM é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por desmielinização das células nervosas, que leva a severa deficiência psicomotora. Tem sido reportado que o acúmulo intracelular de GMPc modula a reação microglial e astrocitária e protege oligodendrócitos diferenciados (formadores da mielina), reduzindo danos causados à mielinização. Portanto, o presente estudo investigou os efeitos do Sildenafil em modelo de EM induzido pela ingestão de Cuprizona. Cinco camundongos C57BL/6 selvagens e cinco iNOS^{-/-}, machos, com 7-10 semanas de idade, foram usados por grupo. Os grupos receberam, durante quatro semanas: 1) Cuprizona 0,2% misturada na ração, 2) Cuprizona na ração e Sildenafil 3, 25 ou 50 mg/Kg na água de beber (os iNOS^{-/-} receberam apenas a dose de 25 mg/Kg), ou 3) Os controles receberam água e ração puras. Após os tratamentos, os cerebelos foram processados de acordo com a rotina para microscopia eletrônica de transmissão, western blotting, imunohistoquímica (parafina), imunofluorescência (congelamento) ou coloração Luxol Fast Blue. Os resultados demonstraram que, nos animais selvagens, Cuprizona induziu temores, limitações motoras e alterações posturais nos animais, aumentou os níveis das proteínas GFAP e Iba-1, indicando gliose reativa e ativação microglial e aumentou COX-2, indicando um ambiente pró-inflamatório no cerebelo; além disso, provocou redução da espessura da mielina e da intensidade de mielinização e promoveu alterações ultraestruturais na bainha de mielina e nos axônios do cerebelo. Sildenafil protegeu significativamente o microambiente neural dos animais tratados com Cuprizona, apresentando efeito dose-dependente, cuja dose mais efetiva foi a de 25 mg/Kg. O tratamento com Sildenafil diminuiu os tremores e limitações motoras induzidos pela Cuprizona, manteve a expressão basal de GFAP e Iba-1, diminuiu fortemente a expressão de COX-2 e das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-2), impediu a desmielinização e protegeu ultraestruturalmente a organização mielínica e axonal. Nos animais iNOS^{-/-}, os efeitos clínicos induzidos pela Cuprizona foram semelhantes aos vistos nos animais selvagens e Sildenafil diminuiu esses efeitos. Cuprizona aumentou a expressão de GFAP, Iba-1 e IFN- γ . Nesses animais, entretanto, Sildenafil aumentou a marcação para GFAP, indicando que não teve efeito protetor nos astrócitos, na ausência do NO produzido pela iNOS. Por outro lado, diminuiu a expressão de Iba-1 e IFN- γ , indicando efeito anti-inflamatório e inativação da micróglia estimulada pela Cuprizona. Os animais iNOS^{-/-} controle (sem nenhum tratamento) apresentaram alterações degenerativas na mielina, que foram agravadas pela Cuprizona. Sildenafil diminuiu a intensidade dessas alterações, embora não tenha resolvido-as completamente. Portanto, o aumento dos níveis de GMPc, pela inibição da PDE5, provavelmente agiu como anti-inflamatório e agente protetor de astrócitos, micróglia e oligodendrócitos, diminuindo os danos ao tecido neural. Interessantemente, a via de ação do Sildenafil foi tipo celular-dependente, ou seja, foi independente do NO produzido pela iNOS em micróglia e oligodendrócitos e dependente em astrócitos. Portanto, após ensaios clínicos, o Sildenafil pode ser um medicamento compatível com a administração oral para a população com EM e outras doenças neurodegenerativas, promovendo efeitos benéficos adicionais aos tratamentos atuais. Esclarecer o mecanismo de ação do Sildenafil nas células neurais será alvo de estudos futuros do nosso grupo.

Palavras-chaves: Micróglia, neuroinflamação, GMPc, astrócitos, óxido nítrico, oligodendrócitos, cerebelo

ABSTRACT

Sildenafil (Viagra®) promotes accumulation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) through selective phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibition. Although this drug remains an excellent safety and tolerability profile, only erectile dysfunction and, more recently, pulmonary hypertension are disease currently treated with Sildenafil. Astrocytes and microglia are cells of the central nervous system, which play an important role in many brain diseases, including multiple sclerosis (MS). MS is a chronic inflammatory disease characterized by axons demyelination, leading to severe psychomotor disabilities. It has been reported that the accumulation of intracellular cGMP modulates the microglia and astrocytic reaction and protects differentiated oligodendrocytes (myelin-forming cells), reducing damage to myelination. Therefore, this study investigated the effects of Sildenafil in a MS model induced by cuprizone ingestion. Five C57BL/6 wild-type and five iNOS^{-/-}, males, 7-10 weeks old, were used per group. The groups were given, for four weeks: 1) Cuprizone 0.2% mixed into a f chow, 2) Cuprizone into a chow and Sildenafil 3, 25 or 50 mg/kg in the drinking water (the iNOS^{-/-} received only 25 mg/kg), or 3) The controls received pure food and water. After treatments, the cerebella were processed, according to routine, for transmission electron microscopy, western blotting, immunohistochemistry (paraffin), immunofluorescence (freezing) or Luxol Fast Blue staining. The results showed that, in wildlife, Cuprizone limitations induced motor and postural changes in animals, increased levels of GFAP and Iba-1 protein, indicating reactive gliosis and microglial activation and increased COX-2, indicating a pro-inflammatory environment in the cerebellum, in addition, caused a reduction in myelin thickness and intensity of myelination and promoted ultrastructural changes in the myelin sheath and axons in the cerebellum. Sildenafil significantly protected the neural microenvironment Cuprizone treated animals, showing a dose-dependent, the optimum dose was 25 mg / kg. Treatment with Sildenafil maintained the basal expression of GFAP and Iba-1, strongly decreased the expression of COX-2 and proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β and IL-2), prevented demyelination, and protected ultrastructurally myelin and axonal organization. In animals iNOS^{-/-}, the clinical effects observed were similar to those seen in wild animals. However, Sildenafil increased the labeling for GFAP, indicating that it had no protective effect on astrocytes in the absence of NO produced by iNOS. On the other hand, Sildenafil decreased expression of Iba-1 and IFN- γ , indicating anti-inflammatory effect and inactivation of microglia stimulated by Cuprizone. Animals iNOS^{-/-} control (no treatment) showed degenerative changes in myelin, which were aggravated by Cuprizone. Sildenafil decreased the intensity of these changes, but has not solved it completely. The increased levels of cGMP, by inhibiting PDE5, probably acted as a protective agent for inflammatory and astrocytes, microglia and oligodendrocytes, reducing tissue damage. Interestingly, the route of action of Sildenafil was cell type-dependent, ie, was independent of NO produced by iNOS in microglia and oligodendrocytes and astrocytes dependent. Therefore, after clinical trials, Sildenafil may be a product compatible with oral administration for people with MS and other neurodegenerative diseases, providing additional benefits to current treatments. To clarify the mechanism of action of Sildenafil on neural cells will be the subject of future studies of our group.

Keywords: microglia, neuroinflammation, astrocytes, cGMP, nitric oxide, oligodendrocytes, cerebellum

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Síntese e receptores de GMPc.
- Figura 2** Funções do GMPc e possíveis usos terapêuticos dos inibidores de PDE5. Os inibidores de PDE5 bloqueiam a degradação do GMPc (painel inferior) levando a um aumento do nível desse segundo mensageiro, que pode exercer sua ação em vários órgãos alvo. O lado direito mostra tanto as aplicações terapêuticas aprovadas, quanto as possíveis aplicações terapêuticas (ponto de interrogação) dos inibidores de PDE5 em humanos.
- Figura 3** Diagrama da interação entre oligodendrócitos, micróglia e astrócitos. durante insulto por Cuprizona e recuperação da desmielinização.
- Figura 4** Gráfico representando a cronologia de desmielinização e remielinização, em modelo de ingestão de Cuprizona em camundongos C57BL/6.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc - Adenosina Monofosfato Cíclico

CPZ- Cuprizona

EM – Esclerose múltipla

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

GFAP- Proteína ácida fibrilar glial

GMPc - Guanosina Monofosfato Cíclico

IFN- γ - Interferon- γ

IL 6 – Interleucina 6

IL-1 β – Interleucina 1 β

ILs - Interleucinas

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LFB- Luxol fast blue

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP-1 - proteína quimioatraente de macrófagos

MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófagos 1 α

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

PDE3 – Enzima fosfodiesterase tipo 3

PDE5 – Enzima fosfodiesterase tipo 5

PDEs – Enzimas fosfodiesterases

PKA - Proteína quinase dependente de AMPc

PKG - Proteína quinase dependente de GMPc

SNC - Sistema nervoso central

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 Comunicação celular na fisiopatologia do sistema nervoso central (SNC): o sistema mensageiro	12
1.2 Sildenafil: Inibidor de fosfodiesterase tipo 5	14
1.3. Sildenafil no SNC	16
1.4. Esclerose múltipla (EM) e Sildenafil	17
1.5. Modelo animal	19
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. JUSTIFICATIVA.....	27
CAPÍTULO 1	28
Sildenafil (Viagra®) down regulates cytokines and prevents demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model	
CAPÍTULO 2	54
O papel do Sildenafil na via NO-GMPc nos efeitos da neuroinflamação e mielinização	
CONCLUSÕES GERAIS	68
ANEXO.....	69

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Comunicação celular na fisiopatologia do sistema nervoso central (SNC): o sistema mensageiro

Os nucleotídeos cíclicos monofosfatados, adenosina e guanosina (AMP e GMP), são importantes mediadores intracelulares de várias moléculas de sinalização, e regulam inúmeros processos intracelulares, tais como motilidade do músculo liso, homeostase de eletrólitos, sinais neuroendócrinos, fototransdução retinal, resposta inflamatória e mielogênese (produção da bainha de mielina) (REDER et al., 2000; TANAKA et al., 1997; BALTRONS et al., 2003; UCKERT et al., 2006; CHUNG, 2006).

O AMPc é sintetizado a partir do ATP por uma proteína transmembrana multipasso chamada adenilil ciclase e é degradado rápida e continuamente por uma ou mais fosfodiesterases (PDEs) de AMPc, que o hidrolisa à sua forma inativa, adenosina 5' monofosfato. Este nucleotídeo cíclico exerce seus efeitos através da interação com uma proteína receptora intracelular, a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que catalisa a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para serinas ou treoninas de determinadas proteínas-alvo, regulando suas atividades (HANSSON V et al., 2000). O GMPc, por sua vez, é produzido pela enzima guanilil ciclase (GC) transmembrana e GC solúvel (GCs) e é também degradado por uma ou mais PDEs. É reconhecido como um importante segundo mensageiro de sinais extracelulares provenientes do óxido nítrico (NO) e peptídeos natriuréticos. Os efeitos fisiológicos deste nucleotídeo cíclico são determinados pelas atividades de três tipos de receptores intracelulares: proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), canais iônicos regulados por GMPc e PDEs reguladas por GMPc (Figura 1). O GMPc também pode ativar vias do AMPc através de sua ligação aos receptores intracelulares de AMPc, tal como a proteína PKA. Desta forma, o GMPc pode alterar a função celular através da ativação ou inativação de proteínas por fosforilação. Algumas funções fisiológicas mediadas pelo GMPc têm sido descritas como fatores regulatórios clássicos no relaxamento do músculo liso, inibição da agregação plaquetária, degranulação de neutrófilos, transdução de sinal visual, entre outras (LINCOLN & CORNWELL, 1993; CORBIN & FRANCIS, 1999).

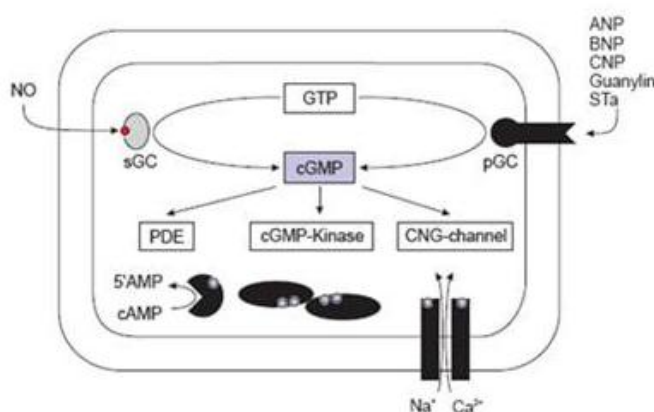


Figura 1 - Síntese e receptores de GMPc. Fonte: extraído de HOFMANN et al. (2000).

No sistema nervoso central (SNC), o GMPc exerce um importante papel como mediador das ações do NO. Este, por sua vez, sinaliza a produção de GMPc, através da ativação da GCs. O NO é um radical livre gasoso, que tem sido amplamente estudado desde o sec.XIX. Ele atua como um importante sinalizador de processos intra e extracelulares (DUSSE et al., 2003). Esse gás é sintetizado intracelularmente por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): i) As formas constitutivas dependentes de Ca^{2+} , consistindo na forma endotelial (eNOS) e a forma neuronal (nNOS); ii) A forma induzível independente de Ca^{2+} (iNOS), presente, entre outras células, em macrófagos e células gliais, que produzem NO após estímulo imunológico (interferon- γ - IFN- γ , fator de necrose tumoral- α - TNF- α , , Lipopolissacarídeo - LPS) (PUZZO et al., 2008). A via NO-GMPc parece estar envolvida na modulação do desenvolvimento do cérebro, plasticidade sináptica, secreção neuroendócrina, processamento sensorial e fluxo sanguíneo cerebral (GARTHWAITE & BOULTON, 1995). Essa via tem sido também reconhecida como mediadora de fenômenos neuropatológicos em condições como epilepsia, derrame e desordens neurodegenerativas. Nessas condições, a via NO-GMPc pode contribuir para a morte celular excitotóxica e dano celular por neuroinflamação (SZABÓ, 1996). O potencial papel neurotóxico do NO tem sido focado em muitos estudos mostrando que a ativação da iNOS na micróglia está envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas, como, por exemplo, em resposta ao peptídeo β -amilóide (doença de Alzheimer) e na severidade da desmielinização e alteração axonal (fenômenos que ocorrem na esclerose múltipla – EM) (WAKITA et al., 2003). A ativação microglial, com conseqüente produção de NO em larga escala e neuroinflamação, portanto, é um dos mecanismos de injúria que pode acometer o SNC e que envolve, possivelmente, a via NO-GMPc.

Por outro lado, tem sido demonstrado que o acúmulo de AMPc e GMPc pode inibir a inflamação (ZHU et al., 2001; KHOSHAKHLAQH et al., 2007), prevenindo os tecidos contra danos causados por esse processo. Esse papel modulador da inflamação exercido pelo AMPc e GMPc é uma ferramenta potencial para interferir na evolução de doenças nas quais o processo inflamatório exerce um papel central, como, por exemplo, a EM.

1.2 Sildenafil: Inibidor de fosfodiesterase tipo 5

As PDEs de mamíferos formam uma grande família e estão subdivididas de acordo com a ordem de descoberta, sequência de aminoácidos e características catalíticas e regulatórias. Estas enzimas hidrolisam os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, às suas formas inativas 5'-monofosfatos (UCKERT et al., 2006; CHUNG, 2006).

O Sildenafil, designado quimicamente como 1-[4-etoxido-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidina-5-il)fenilsulfonil]-4-metilpiperazina citrato, é um inibidor potente e seletivo da PDE5, presente em vários tecidos tais como o vascular, o muscular liso e o neural. Este fármaco foi resultado de um programa que iniciou em 1985, na Sede de Investigação Européia Pfizer em Sandwich, UK, com finalidade de desenvolver um inibidor de PDE5 para estimular a via NO-GMPc para o tratamento de angina pectoris em pacientes com doença arterial coronária. Esta droga foi patenteada em 1996, e aprovada para o uso terapêutico na disfunção erétil (DE) em 1998 (Viagra®, Pfizer) (NAYLOR et al., 1996; BALLARD et al., 1996; SCHWARZ et al., 2007). Em 2005, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou o uso do Sildenafil (nome comercial: Revatio, Pfizer) no tratamento da hipertensão pulmonar (ZHAO et al., 2001; 2003).

A PDE5 hidrolisa especificamente o GMPc, contribuindo para o controle da concentração intracelular deste nucleotídeo. Esta enzima é um homodímero, e cada monômero é uma proteína quimérica composta por um domínio regulatório (R) e um catalítico (C) que transforma o GMPc em 5'-GMP. O domínio R contém vários subdomínios funcionais, incluindo sítios de fosforilação, sítios alostéricos de ligação de GMPc e contatos de dimerização. A ligação do GMPc ao sítio alostérico da PDE5 ativa a fosforilação da enzima pela PKG, resultando em uma maior afinidade deste nucleotídeo cíclico ao domínio R e aumento de sua taxa de hidrólise pelo sítio catalítico. Este efeito está envolvido na regulação por feedback negativo dos níveis celulares de GMPc. O Sildenafil é um inibidor competitivo da catálise pela PDE5, e representa um análogo não hidrolisável pelo sítio catalítico da enzima. Sua administração promove um efeito de feedback positivo, representado pela inibição da degradação, com acúmulo do GMPc, através da interação do Sildenafil com o domínio C (BLOUNT et al., 2007; CORBIN et al., 2003).

Este fármaco tem sido amplamente utilizado no tratamento da DE, descrita como a inabilidade do homem em atingir e manter a ereção do pênis. A ereção normal ocorre em resposta à estimulação sexual, que promove a liberação de NO a partir de neurônios e do endotélio dos corpos cavernosos do pênis. O NO ativa a GCs, levando à formação de GMPc, que causa relaxamento do músculo liso por reduzir a concentração de cálcio intracelular. Os espaços lacunares do tecido são preenchidos com sangue e a pressão intracavernosa aumenta, tornando o pênis ereto. Em resposta ao estímulo sexual, o Sildenafil promove a ereção através da inibição seletiva da PDE5. Logo, a inibição desta enzima eleva a concentração de GMPc e, com isso, potencializa o relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos. A dose oral recomendada de Sildenafil é de 50mg em uma dose única, administrada aproximadamente uma hora antes da atividade sexual, e com frequência de uma vez ao dia (LANGTRY & MARKHAM, 1999; PFIZER, 1998).

Além de manter um excelente nível de segurança e perfil de tolerabilidade no tratamento da DE, Sildenafil também parece fornecer um benefício prolongado para várias outras doenças. Entretanto, não obstante o grande potencial desses inibidores (Figura 2), as únicas patologias tratadas atualmente com os inibidores de PDEs são a DE e, mais recentemente, hipertensão pulmonar (dose: 20mg/ 3 vezes ao dia). Isso é devido à complexidade da família de PDE e à seletividade dos inibidores usados. Estudos têm relatado uma importante ação do Sildenafil em modelos animais de desordens relacionadas ao SNC, entretanto, existem poucos dados sobre esses efeitos na literatura.

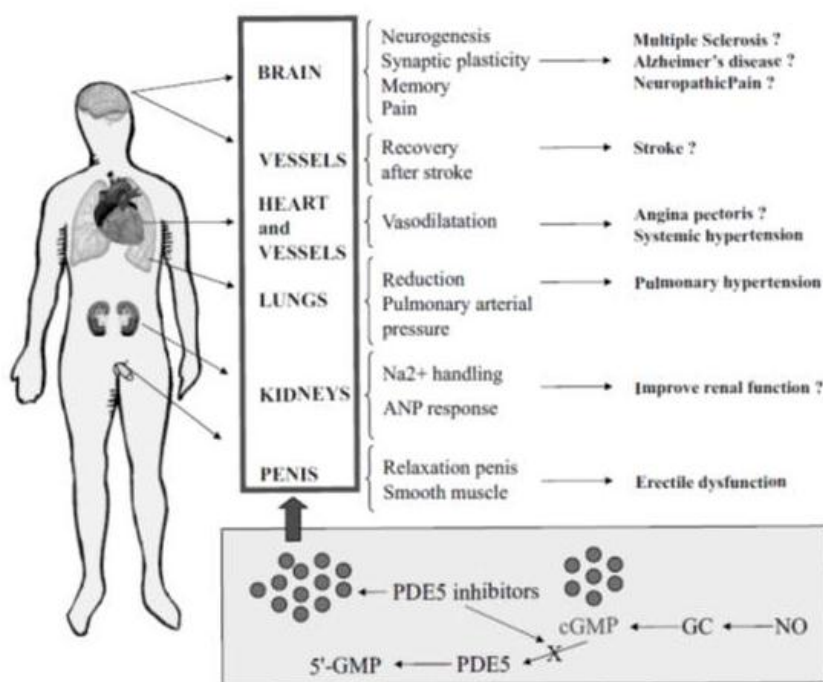


Figura 2 - Funções do GMPC e possíveis usos terapêuticos dos inibidores de PDE5. Os inibidores de PDE5 bloqueiam a degradação do GMPC (painel inferior) levando a um aumento do nível desse segundo mensageiro, que pode exercer sua ação em vários órgãos alvo. O lado direito mostra tanto as aplicações terapêuticas aprovadas, quanto as possíveis aplicações terapêuticas (ponto de interrogação) dos inibidores de PDE5 em humanos. Adaptado de PUZZO et al. (2008).

1.3. Sildenafil no SNC

Alguns estudos têm sido direcionados a esclarecer os efeitos do Sildenafil em processos fisiopatológicos do SNC. Várias linhas de evidência indicam, por exemplo, que a inibição da PDE5 com Sildenafil oferece novas estratégias para o tratamento da perda de memória relacionada com a idade (UTHAYATHAS et al., 2007). Sildenafil reduz déficits neurológicos, aumenta a recuperação funcional e neurogênese após derrame em ratos (ZHANG et al., 2002; 2006), atenua vasoespasm cerebral e melhora a recuperação funcional após hemorragia subaracnóidea experimental (HAN, et al., 2011) e controla níveis de hormônios e neurotransmissores envolvidos na depressão (SAH et al., 2011). De acordo com OREJANA et al. (2011), o Sildenafil tem efeito benéfico em disfunções do cérebro relacionadas com o período de envelhecimento, podendo ser um tratamento emergente para patologias, como a doença de Alzheimer. Tem sido demonstrado também que esse inibidor de

PDE5 melhora a função neurológica em camundongos diabéticos, atuando sobre a remielinização de fibras neuronais e protegendo as células de Schwann (WANG et al., 2011). Além disso, o Sildenafil aumenta os níveis de GMPc no cérebro e exerce efeitos neuroprotetores em pacientes com EM, que utilizaram essa droga no tratamento de DE (FIRESTEIN et al., 1998).

A ação do Sildenafil em melhorar o quadro clínico de pacientes com EM tem sido atribuída à indução de neurogênese, embora informações disponíveis sobre o seu efeito e o seu mecanismo de ação em modelo experimental de EM ainda sejam escassas. O inibidor cilostazol, específico para PDE3, melhorou o quadro clínico de EM e induziu uma menor produção de IFN γ pelos linfócitos, comparado com os animais controle (KURESHIRO et al., 2009). Poucos dados estão disponíveis sobre a ação do Sildenafil na evolução clínica da EM, bem como no quadro de neuroinflamação e desmielinização, que são os principais fenômenos relacionados com a patogênese dessa doença.

1.4. Esclerose múltipla (EM) e Sildenafil

EM é uma doença inflamatória crônica do SNC, caracterizada por desmielinização das células nervosas, que leva à severa deficiência psicomotora. Inflamação e dano à bainha de mielina levam à injúria neuronal e o resultado podem ser múltiplas áreas de cicatrizes (esclerose) no SNC. Eventualmente, essas cicatrizes ou esclerose podem diminuir ou bloquear os sinais nervosos que controlam a coordenação muscular, força, sensibilidade e visão. A EM afeta mais de 30.000 indivíduos no Brasil e 2.5 milhões em todo o mundo, com um início típico durante os anos produtivos, entre as idades de 20 e 50 anos. Apesar de o caráter autoimune/inflamatório da EM já estar bem elucidado, a resposta clínica aos imunossuppressores tem sido desapontadora e o controle da doença obtido com essas drogas sempre foi insuficiente (JOHNSON, 2000). A introdução recente de imunomoduladores como o interferon- γ produziu diminuição da frequência e severidade das recidivas (REDER et al., 2000).

Acredita-se que essa doença seja uma desordem autoimune mediada por células imunes ativadas, tais como linfócitos-T e B, macrófagos/micróglia e astrócitos, cuja ação inflamatória culmina em dano e destruição da bainha de mielina. Os linfócitos são condicionados em tecidos periféricos por antígenos (geralmente uma infecção persistente, embora não se saiba ao certo o que desencadeia a reação auto-imune inicial), clonalmente expandidos e infiltrados no SNC, onde ativam células gliais (micróglia e astrócitos). Ambos (linfócitos e células gliais) exercem os seus efeitos através da produção de citocinas pró-inflamatórias e NO. Linfócitos B também são ativados e produzem anticorpos contra antígenos presentes na mielina. Esses eventos levam à desmielinização e degeneração axonal (KHOSHAKHLAQH et al., 2007).

Micróglia são os macrófagos teciduais residentes no SNC e são os principais mediadores da inflamação. Em seu estado de repouso, a micróglia apresenta um corpo celular pequeno e numerosos processos (prolongamentos) ramificados (uma morfologia altamente ramificada). No tecido neural saudável, esses processos são estruturas dinâmicas que alongam e retraem, monitorando seu microambiente (NIMMERJAHN, 2005; RAIVICH, 2005). Na presença de estímulos ativadores, a expressão dos receptores da superfície dessas células é modificada e as células mudam de um papel de monitoramento, para um de proteção e reparo (Revisado por TANSEY et al., 2007; TANSY & WISS-CORAY, 2008). Além disso, a micróglia ativada secreta uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (TNF e Interleucinas IL-1 β e IL6) e quimiocinas (proteína inflamatória de macrófagos MIP-1 α , proteína quimioatraente de macrófagos MCP-1), que promovem o estado inflamatório. A morfologia dessas células muda de ramificada para amebóide, assumindo um papel fagocítico. Quando a micróglia é moderadamente ativada, desempenha um papel benéfico, tal como remoção de neurotoxinas, células mortas e restos celulares, bem como a secreção de fatores tróficos que promovem a sobrevivência neuronal. Entretanto, a ativação persistente da micróglia pode aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos celulares (barreira hematoencefálica) e promover infiltração de macrófagos periféricos, os quais possuem um fenótipo criticamente determinado pelo ambiente do SNC (as células imunes periféricas são reativadas e clonadas dentro do SNC, pelo estímulo das células residentes) (SCHIMID et al., 2009).

A resposta neuroinflamatória parece ser o principal fator que resulta em perda de populações de neurônios na progressão da EM (FRANK-CANNON et al., 2009). A sustentada liberação de mediadores inflamatórios pela micróglia trabalha para perpetuar o ciclo inflamatório, ativando micróglia adicional, promovendo sua proliferação e resultando em maior liberação de fatores inflamatórios. Além disso, evidências recentes indicam que a desmielinização, lesão da substância branca e degeneração de oligodendrócitos (células formadoras da mielina) seguem disfunção de astrócitos induzida por inflamação (SHARMA et al., 2010). Portanto, a neuroinflamação residente mediada pelas células gliais (astrócitos e micróglia) parece ser o principal fenômeno que perpetua o dano neural na EM.

Entretanto, a adesão de linfócitos-T ao endotélio cerebral diminui com a incubação do endotélio com doadores de NO. Esse efeito é bloqueado pelo inibidor de GC e reproduzido por agonista de GMPc (WONG et al., 2005). Portanto, é um efeito dependente da geração de GMPc. Esses achados sugerem que o NO pode modular a adesão de linfócitos-T aos microvasos cerebrais humanos através de mecanismo dependente de GMPc e pode, portanto, regular o tráfico de linfócitos durante inflamação do SNC e patogênese da EM. Tem sido reportado também que o acúmulo intracelular de GMPc reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ ,

TNF- α , e interleucinas (ILs), e reduz o estresse oxidativo, modulando a resposta inflamatória (ZHU et al., 2001; KHOSHAKHLAQH et al., 2007). Além disso, a inibição das PDEs parece bloquear a resposta inflamatória da micróglia, reduzindo as alterações da bainha de mielina (PARIS et al., 2000; WAKITA et al., 2003). O acúmulo de GMPc é, portanto, uma ferramenta potencial para modular a neuroinflamação e reduzir os danos à bainha de mielina, na patogênese da EM.

Estudos têm demonstrado que o Sildenafil teve um efeito modulador, reduzindo a inflamação em modelos de doenças inflamatórias crônicas (KHOSHAKHLAQH et al., 2007; VISSER et al., 2009 ; HEMNES et al., 2008). Esse fármaco poderia ser um agente inibidor da ativação de células gliais em modelo de EM, promovendo a re-mielinização e limitando a progressão da doença. Portanto, é importante esclarecer se o Sildenafil age inibindo a ativação de micróglia e astrócitos e protegendo oligodendrócitos, promovendo a re-mielinização e/ou impedindo a desmielinização, em modelo de EM.

1.5. Modelo animal

O cobre é um elemento essencial para uma série de metaloenzimas , incluindo cobre-zinco superóxido dismutase e ceruloplasmina, presentes no SNC. A Cuprizona (oxalic-bis-cyclohexylidenehydrazide) é um quelante de cobre produzido para uso em pesquisa animal. A administração de cuprizona leva a uma redução na atividade cerebral de citocromo-oxidase bem como de outras enzimas ligadas à mitocôndria. Dessa forma, cuprizona induz déficit de cobre que prejudica a função mitocondrial no cérebro, provocando alterações de metabolismo energético em células de oligodendrócitos levando à desmielinização (MORELL AND BARRETT et al., 1998).

A cuprizona causa intoxicação no SNC, afetando especificamente micróglia e astrócitos (ativando-os) e provocando perda da mielina e oligodendrócitos (Figura 3) durante as primeiras semanas de ingestão da cuprizona (administrada na ração) (FRANCO-PONS et al, 2007). O modelo de desmielinização por cuprizona induz astrocitose hipertrófica e hiperplásica e não ativa células imunes periféricas (GROEBE et al., 2009), fornecendo um importante modelo para análise da reação inflamatória restrita às células gliais. A ingestão de cuprizona induz desmielinização, sendo o curso de tempo exato dependente da dose de cuprizona e da idade de aplicação. Após a fase crônica da desmielinização, cujo pico ocorre após quatro semanas de administração da cuprizona, os animais podem ser recuperados por remoção da cuprizona da dieta. Dentro das quatro semanas seguintes à retirada da cuprizona da ração, há remielinização substancial (Figura 4) (LUDWIN SK et al.,1982).

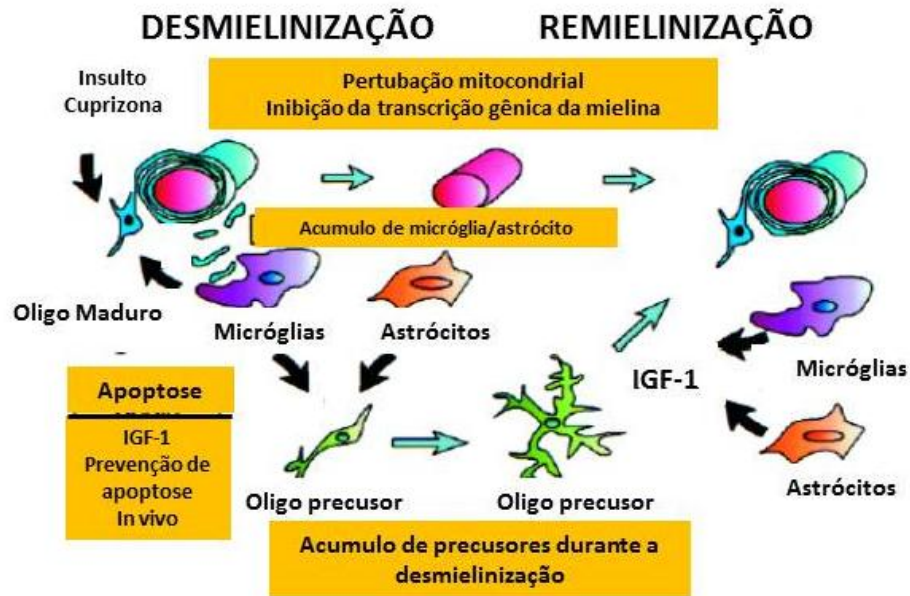


Figura 3 – Diagrama da interação entre oligodendrócitos, micróglia e astrócitos durante insulso por Cuprizona e recuperação da desmielinização (Adaptado de MATSUSHIMA & MORELL, 2001).

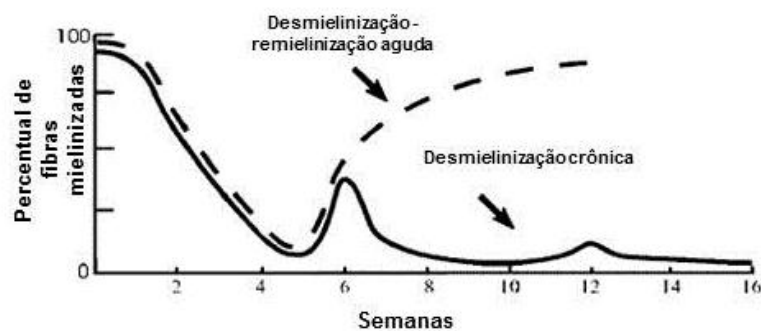


Figura 4 - Período de desmielinização e remielinização, em modelo de ingestão de Cuprizona em camundongos C57BL/6 (MATSUSHIMA et al., 2001)

Esse agente causa, portanto, neuroinflamação e desmielinização e tem sido usado como um modelo de estudo desses dois fenômenos. A neuroinflamação induzida pela Cuprizona é limitada às células residentes do SNC, sem nenhum envolvimento de células imunes periféricas. Recentemente tem sido reportado na literatura que o Sildenafil tem papel neuroprotetor sobre as células gliais (PIFARRE et al, 2011) e atua protegendo as células neurais contra danos do estresse oxidativo. Uma vez que a neuroinflamação residente mediada por células da glia (astrócitos e microglia) parecem ser o principal fenômeno que perpetua os danos neurais em MS, esse modelo é muito útil para estudar a ação de fármacos em EM.

REFERÊNCIAS

- ARNETT H. A., *et al.* The protective role of nitric oxide in a neurotoxicant-induced demyelinating model. **J. Immunol.**, v. 168, p. 427-433, 2010.
- BALLARD S. A., *et al.* Sildenafil, an inhibitor of Phosphodiesterase type 5, enhances nitric oxide mediated relaxation of human corpus cavernosum. **Int. J. Impot. Res.**, v. 8, p. 103, 1996.
- BALTRONS M. A., *et al.* Regulation of NO-dependent cyclic GMP formation by inflammatory agents in neural cells. **Toxicol. Lett.**, v. 139, p. 191-198, 2003.
- BENJAMINS JA & NEDELKOSKA L. Cyclic GMP-dependent pathways protect differentiated oligodendrocytes from multiple types of injury. **Neurochem Res**, v. 32, p. 321-9, 2007.
- BLOUNT M. A., *et al.* Conversion of phosphodiesterase-5 (PDE5) catalytic site to higher affinity by PDE5 inhibitors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 323, p. 730-737, 2007.
- CHUNG K. F., *et al.*, Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 533, p. 110-172, 2006.
- CORBIN J. D. & FRANCIS S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of Sildenafil. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 13729-13732, 2003.
- DUSSE L. M. S., *et al.*, Revisão sobre Óxido Nítrico. **Jornal brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.
- FRANCO-PONS N, TORRENTE M, COLOMINA MT, VILELLA E. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. **Toxicol Lett.** 30;169(3):205-13, 2007.
- FIRESTEIN B. L., BREDET D. S. Regulation of sensory neuron precursor proliferation by cyclic GMP-dependent protein kinase. **J Neurochem**, v. 71, p. 1846-1853, 1998.
- GARTHWAITE, J, & BOULTON C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 683-706, 1995.
- GLENN K. MATSUSHIMA, PIERRE MORELL. The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System **Brain Pathology** 11: 107-116, 2001.
- GROEBE A, CLARNER T, BAUMGARTNER W, DANG J, BEYER C, KIPP M. Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrogliosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. **Cerebellum** Sep;8(3):163-74, 2009.
- HAN BH, VELLIMANA AK, ZHOU ML, MILNER E, ZIPFEL GJ. Phosphodiesterase 5 Inhibition Attenuates Cerebral Vasospasm and Improves Functional Recovery after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. **Neurosurgery.**, v.70.p 178-187, 2011.
- HANSSON V., SKALHEGG B. S., TASKÉN K. Cyclic-AMP dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 73, p. 81-92, 2000.

HEMNES A. R., *et al.* PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. **Am. J. Physiol.**, v. 294, p. L24-L33, 2008.

JOHNSON K. P., *et al.*, Therapy of relapsing forms. In: Burks J. S.; Johnson K. P., editors. **Multiple Sclerosis**. New York: Demos Med Publish; 2000.

KHOSHAKHLAQH P., *et al.* Beneficial effect of phosphodiesterase-5 inhibitor in experimental inflammatory bowel disease; molecular evidence for involvement of oxidative stress. **Toxicol. Mech. Methods**, v. 17, p. 281-288, 2007.

KURESHIRO J., *et al.* Selective phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol ameliorates autoimmune encephalomyelitis. **Neuroreport**, v. 20, p. 718-722, 2009.

LANGTRY H. D., MARKHAM A. Sildenafil: A review of its use in erectile dysfunction. **Drugs**, v. 57, p. 967-989, 1999.

LINCOLN T. M. & CORNWELL T. L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. **FASEB J.**, v. 7, p. 328-338, 1993.

LUDWIN SK *et al.*, Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse. An ultrastructural study of cuprizone toxicity. **Lab Invest** 39:597-612, 1998.

MORELL P, BARRETT CV, MASON JL, TOEWS AD, HOSTETTLER JD, KNAPP GW, MATSUSHIMA GK. Gene expression in the brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. **Mol Cell Neurosci** 12:220-227, 1998.

NAYLOR A., *et al.* Sildenafil (VIAGRA): an inhibitor of cyclic GMP-specific Phosphodiesterase type 5 for the treatment of male erectile dysfunction. **Eur. Urol.**, v. 30 (suppl 2), p. 158, 1996.

NIMMERJAHN A, KIRCHHOFF F, HELMCHEN F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, may 27;308 (5726):1314-8, 2005.

OREJANA L, PUERTA E, BARROS-MIÑONES L, HERVIAS I, GOMEZ-RODRIGUEZ V, PIZARRO N, DE LA TORRE R, JORDÁN J, AGUIRRE N. Long-lasting neuroprotective effect of Sildenafil against 3,4-methylenedioxymethamphetamine- induced 5-hydroxytryptamine deficits in the rat brain.. **J Neurosci Res.**, V.90 p.518-28, 2011.

PFIZER. Monografia do produto. **Copyright Laboratórios Pzifer Ltda.** 1998.

PIFARRE P, PRADO J, BALTRONS MA, GIRALT M, GABARRO P, FEINSTEIN DL, HIDALGO J, GARCIA A. Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. **Acta Neuropathol** Apr;121(4):499-508, 2011.

PUZZO D., *et al.* Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 4, p. 371-387, 2008.

RAIVICH G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. **Trends Neurosci**, Nov; 28(11):571-3, 2005.

REDER AT, ANTEL JP. Injecting rationale into interferon-beta therapy. **Neurology**, v. 54, p. 2034-2035, 2000.

SAH SP, MATHELA CS, CHOPRA K., Involvement of nitric oxide (NO) signalling pathway in the antidepressant activity of essential oil of *Valeriana wallichii* Patchouli alcohol chemotype.. **Phytomedicine**, v.18, p 1269-75, 2011.

SCHIMID C.D., MELCHIOR B, MASEK K, PUNTAMBEKAR SS, DANIELSON PE, LO DD, SUTCLIFFE JG, CARSON MJ. Differential gene expression in LPS/IFN γ activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. **J. Neurochem** 109:117-125, 2009.

SCHWARZ E. R., *et al.* The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. **Int. J. Imp. Res.**, v. 19, p. 139-148, 2007.

SHARMA R, FISCHER MT, BAUER J *et al.* Inflammation induced innate immunity in central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. **Acta Neuropathol** 120:223-236, 2010.

SZABÓ C., *et al.*, Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. **Brain Res. Bull.**, v. 41, p. 131-141, 1996.

TANAKA J., *et al.* Nitric oxide-mediated cGMP synthesis in oligodendrocytes in the developing rat brain. **Glia**, v. 19, p. 286-297, 1997.

TANSEY MG, MCCOY MK, FRANK- CANNON TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Exp Neurol**. 208: 1-25, 2007.

TANSEY MG, WYSS-CORAY T : Cytokines in CNS inflammation and disease. In Central Nervous System Diseases and Inflammation, **TEC Edited by:** Lane M, Bergmann C, Wyss- Coray T. Springer., 59-106, 2008.

UCKERT S., *et al.*, Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. **Eur. Urol.**, v. 50, p. 1153-1156, 2006.

UTHAYATHAS S., *et al.* Versatile effects of Sildenafil: recent pharmacological applications. **Pharmacol. Rep.**, v. 59, p. 150-163, 2007.

VISSER Y. P., *et al.* Sildenafil attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition, mortality and right ventricular hypertrophy in neonatal hyperoxic lung injury. **Respir. Res.**, v. 10, p. 30-45, 2009.

WAKITA H., *et al.*, Ibudilast, a phosphodiesterase inhibitor, protect against white matter damage under chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Brain Res.**, v. 992, p. 53-59, 2003.

WONG D., *et al.* Nitric oxide reduces T lymphocyte adhesion to human brain microvessel endothelial cells via a cGMP-dependent pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 514, p. 91-98, 2005.

ZHANG, Y.Q., Rodesch, C.K., Broadie, K. Living synaptic vesicle marker: synaptotagmin-GFP. **Research Paper**, v. 34(1-2): 142—145, 2002.

ZHANG R. L., *et al.*, Delayed treatment with Sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. **J. Neurosci. Res.**, v. 83, p. 1213-1219, 2006.

ZHAO L., *et al.* Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 104, p. 424-8, 2001.

ZHAO L., *et al.*, Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic peptide activity. **Circulation**, v. 107, p. 234-7, 2003.

ZHU J., *et al.*, The antidepressant and anti-inflammatory effects of rolipram in the central nervous system. **CNS Drug Rev.**, v. 7, p. 387-398, 2001.

2. **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo Geral**

Caracterizar o efeito e o mecanismo de ação do Sildenafil, *in vivo*, sobre a evolução clínica, a ativação de astrócitos e micróglia, a neuroinflamação e mielinização, em modelo de Esclerose Múltipla induzido por Cuprizona em camundongos C57BL/6 selvagens. Avaliar o papel do NO nos efeitos do Sildenafil no SNC, em camundongos C57BL/6 *knockouts* para iNOS submetidos a modelo de EM.

2.2 **Objetivos Específicos**

- a) Caracterizar os sinais clínicos nos grupos controle e experimentais em modelo de desmielinização (Cuprizona) após tratamento com Sildenafil;
- b) Estabelecer os níveis de GFAP, Iba-1 e citocinas pró-inflamatórias, no cerebelo, por imunohistoquímica e western blotting em modelo de desmielinização (Cuprizona) após tratamento com Sildenafil;
- c) Avaliar a mielinização através de microscopia de luz e eletrônica de transmissão em modelo de desmielinização após tratamento com Sildenafil;
- d) Avaliar o papel do óxido nítrico na ação do Sildenafil, tratando animais *knockouts* para iNOS e analisando parâmetros inflamatórios e a mielinização.

3. JUSTIFICATIVA

A ampla distribuição da PDE5 e a disponibilidade de inibidores seletivos para essa enzima proporcionou o desenvolvimento de novos estudos para o tratamento de insuficiência cardíaca, hipertensão pulmonar, depressão e inflamação. Esse novo progresso está, certamente, contribuindo para uma melhor abordagem médica em relação aos problemas de sexualidade e à qualidade de vida. O uso de inibidores da PDE5 é, atualmente, aprovado pela FDA para o tratamento de disfunção erétil e hipertensão pulmonar, no entanto, o tratamento de muitas outras doenças pode ser beneficiado com essas drogas.

Entre essas doenças, uma atenção especial deve ser dada às doenças do SNC caracterizadas por declínio cognitivo e motor, como a doença de Alzheimer e a esclerose múltipla. O controle da esclerose múltipla, obtido com as drogas usualmente utilizadas para tratamento, é insuficiente.

Drogas moduladoras da inflamação são potencialmente úteis e podem ser identificadas como novos medicamentos de primeira escolha, ou adicionar efeitos benéficos aos tratamentos padrão, complementando a terapia com imunomoduladores. Uma vez que o Sildenafil induz neurogênese e tem potencial antiinflamatório, é possível que seja efetivo em reduzir a desmielinização (ou induzir a re-mielinização), melhorando o quadro clínico da EM. O Sildenafil poderá, futuramente, contribuir para um tratamento mais eficaz e para a melhora na qualidade de vida de pessoas com doenças neurodegenerativas.

Portanto, este estudo analisou a ação do Sildenafil sobre a ativação de células gliais e a mielinização, em modelo experimental de desmielinização (Cuprizona) induzido em camundongos C57BL/6 wild type e *knockout* para iNOS, esclarecendo o seu efeito sobre essa desordem do SNC.

CAPÍTULO 1

Sildenafil (Viagra®) down regulates cytokines and prevents demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model

Corresponding author: *Christina Peixoto
Laboratório de Microscopia Eletrônica
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)
Av. Profº Luiz Freire, nº 01 Cidade Universitária
CEP 50 740-540, Recife-PE, Brazil
e-mail: peixoto.christina@gmail.com
Tel. (55) (81) 33347230; Fax. (55) (81) 33347221

Sildenafil (Viagra®) down regulates cytokines and prevents demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model

Ana Karolina Santana Nunes^{1,2}, Catarina Rapôso^{1,3}, Rayana Luna Leal², Maria Alice da Cruz-Höfling³, Christina Alves Peixoto^{1,2*}

¹Laboratório de Microscopia Eletrônica, Ministério de Ciência e Tecnologia, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (MCTI/CETENE), Recife, PE, Brazil;

²Laboratório de Ultraestrutura, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brazil;

³Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Contributed equally to the development of this study

ABSTRACT

Sildenafil induces cGMP accumulation through phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibition. cGMP-pathways protect oligodendrocytes and modulate astroglial and microglial reactions. Microglia and astrocytes play an important role in perpetuating multiple sclerosis (MS), a chronic inflammatory disease characterized by demyelination. Therefore, sildenafil can be a potential tool for MS treatment. The present study investigated the effects of sildenafil on the myelin structure and astrocyte/microglia-mediated neuroinflammation in an animal model of MS. Cuprizone-induced demyelination and neuroinflammation in rodents has been widely used as a model for MS. Herein, five male C57BL/6 mice (7-10 weeks old) were used per group. Over a four-week period, the different groups received the following: 1) cuprizone (0.2%) mixed into the chow; 2) cuprizone in the chow and sildenafil (Viagra®; 3, 25 or 50 mg/kg) in the drinking water; or 3) pure chow and water (control group). Cerebella were analyzed using transmission electron microscopy, western blotting, immunohistochemistry and luxol fast blue staining. Cuprizone induced tissue damage, with an increase in GFAP, Iba-1 and COX-2 and demyelination in comparison to the control group. However, cuprizone did not affect the expression of cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β and IL-2). Sildenafil reduced GFAP (25 and 50 mg/Kg) and Iba-1 expression (25 mg/kg) in comparison to the cuprizone group, indicating the modulation of astrocytes and microglia, respectively. Sildenafil ultrastructurally preserved myelin and axons and strongly reduced IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2 and COX-2 expression in comparison to the control and/or cuprizone groups. The results demonstrate a protective effect of sildenafil in the cerebellum. Thus, well-designed clinical trials may demonstrate that the oral administration of sildenafil can be suitable for individuals with MS and other neuroinflammatory/neurodegenerative diseases, providing additional benefits to current treatments.

Keywords: Microglia, Astrocytes, Nitric Oxide, cGMP, Oligodendocytes, Cerebellum

1. Introduction

Demyelination in the central nervous system (CNS) is often associated with acute and chronic inflammatory events involving the recruitment-activation of microglia/macrophages, astrocytes and leukocytes, with the release of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide (NO) [1,2,3]. This neuroinflammatory mechanism can lead to neurodegenerative diseases, such as multiple sclerosis (MS), which is the most common neurological disorder in young adults in the Western world [4,5,6]. In addition to the well-characterized inflammatory white matter, studies have suggested axon injury, changes in the blood-brain barrier (BBB) and reactive astrogliosis and microgliosis [7,8].

Neuroinflammatory responses seem to begin prior to any significant loss of neuronal populations in the progression of MS [9]. The sustained inflammatory mediators released by the microglia perpetuate the inflammatory cycle, activating additional microglia, promoting their proliferation and resulting in the further release of inflammatory factors. Persistent activation of brain-resident microglia may increase the permeability of the BBB and promote the increased infiltration of peripheral macrophages, the phenotype of which is critically determined by the CNS environment (peripheral immune cells are cloned and reactivated in the brain by the stimulus of resident cells) [10]. Moreover, recent evidence indicates that demyelination and oligodendrocyte degeneration follow inflammation induced by astrocyte dysfunction [9]. Therefore, neuroinflammation mediated by glial cells (astrocytes and microglia) seems to be the main phenomenon perpetuating neural damage in MS.

Current treatment options for relapsing-remitting MS are only partially effective and require a parenteral route of administration, as oral therapy is not available. Although the autoimmune and inflammatory nature of MS is well elucidated, the clinical response to immunosuppressors has been disappointing and the control of the disease by these drugs is insufficient [11]. The recent introduction of immunomodulators, such as interferon-beta, has led to a decrease in the frequency and severity of relapses [12]. As MS is the result of an imbalance in immune/inflammatory mechanisms, the identification and combination of drugs that can modulate inflammatory and immune responses through different mechanisms may offer beneficial effects. Moreover, the identification of drugs that directly act on resident inflammatory cells of the CNS may improve the treatment of MS, contributing to the control of relapses.

Mice deficient of inducible nitric oxide synthase (iNOS) develop more severe MS [13], suggesting that NO may be neuroprotective. NO is the main activator of soluble guanylyl cyclase (sGC), which is an enzyme that synthesizes cyclic GMP (cGMP) [14]. The NO-cGMP pathway plays an important role in the CNS, participating in learning and memory mechanisms (to which cerebellum is involved), protecting oligodendrocytes and modulating microglia/macrophage activation [15,16,17]. cGMP levels are regulated by specific phosphodiesterases (PDEs), enzymes that breakdown the phosphodiesteric bond of cGMP and cAMP. Several PDE inhibitors have been developed and used as therapeutic agents because they increase cyclic nucleotide levels by blocking the PDE function, thereby improving NO-cGMP signaling [18]. Thus, the modulation of NO-cGMP signaling could be a new pathway for intervention in cases of MS.

Sildenafil (Viagra, Pfizer) induces cGMP accumulation through selective PDE5 inhibition. This drug was approved for therapeutic use in erectile dysfunction and is also currently used for the treatment of pulmonary hypertension. Despite its excellent tolerability profile, these are the only diseases currently treated with sildenafil. Studies have shown that the selective PDE5 inhibitors sildenafil and vardenafil (Levitra; Bayer) and the PDE4 inhibitor ibudilast raise cGMP/cAMP levels in the brain and offer protective effects, such as improved memory in elderly rats [19] and mice [20] and a decrease in white matter damage in ischemic cerebrovascular injury [21]. Patients with MS report that sildenafil improves their general clinical state; these effects were initially attributed to better gray matter

perfusion in the brain [22]. However, it is possible that sildenafil protects the CNS in patients with MS through the modulation of neuroinflammation [16].

Some characteristics of MS in the central nervous tissue have been induced in mouse by cuprizone ingestion. This model is characterized by primary and reversible demyelination due to peripheral immune system-independent myelin injury [4]. Demyelination is accompanied by a well-characterized sequence of events involving the depletion of mature oligodendrocytes, microglia activation and astrocyte proliferation [7]. Therefore, cuprizone-induced demyelination and neuroinflammation in rodents has been widely used as a model for MS [23,24].

The present study demonstrates that sildenafil (Viagra®) administration ameliorates cuprizone-induced MS by modulating the innate neuroinflammatory response (mediated by glial cells) and prevents demyelination. The data shown here suggest a beneficial effect of cGMP-PDE inhibition in brain injury through the regulation of glial inflammatory responses. The Food and Drug Administration (FDA) has recently approved the daily use of the PDE5 inhibitor tadalafil (Cialis; Lilly) (see <http://www.clinicalspace.com/news>) and, in 2005, the FDA approved sildenafil (Revatio, Pfizer) for the treatment of pulmonary hypertension with daily doses. Moreover, PDE5 inhibitors are widely used to treat erectile dysfunction and pulmonary hypertension. Thus, it is possible that well-designed clinical trials may demonstrate that the oral administration of sildenafil is suitable for individuals with neurodegenerative diseases.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Five C57BL/6 mice aged 7 to 10 weeks and weighing 15 to 20 g were used per group. The mice were examined for health status, acclimated to the laboratory environment at 25 °C and 12-h light/dark photoperiod and housed in metal cages. The control group received standard laboratory diet and pure water. Over a four-week period, the experimental groups received either 0.2% cuprizone (oxalic-bis-cyclohexylidenehydrazide – Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) mixed into the chow and pure water or 0.2% cuprizone in the chow and 3, 25 or 50 mg/kg of body weight of sildenafil (Pfizer Inc., New York, NY, USA) administered through the drinking water, according to methodology previously standardized [25,26]. Body weight was every week and the drug concentration in the water was adjusted to maintain the dose. All experiments were carried out in compliance with ethical guidelines for animal experimentation (L-102010–CEUA/FIOCRUZ). After treatment, the experimental and control animals were anaesthetized with ketamine (115 mg/kg, i.m.) and xylazine (10 mg/kg, i.m.) (Sespo Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brazil).

2.2. Immunohistochemistry

After anesthesia, the animals were transcardially perfused with physiological saline (20 ml), followed by 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) (40 ml) in 0.1 M phosphate (sodium phosphate monobasic and dibasic heptahydrate - Sigma-Aldrich) buffered saline (PBS), pH 7.2. The cerebella were immediately removed and post-fixed in the same fixative overnight. The samples were dehydrated in an ethanol series (Isofar Chemical Co., RJ, Brazil), cleared in xylol and embedded in paraffin (Merck, catalog number: 1071642504). Sections with a thickness of 5 µm were cut on an RM 2035 microtome (Reichert S, Leica), re-hydrated, washed in 0.05 M PBS and incubated in this buffer with 1% bovine serum albumin (BSA, fraction V) (Miles, Naperville, IL, USA) for one hour. Endogenous peroxidase was blocked and antigen retrieval was performed, pre-treating the sections with 20 mM citrate buffer, pH 6.0, at 100 °C, for 30 min. All groups were incubated with the rabbit polyclonal primary antibodies anti-GFAP (DakoCytomation, CA, USA, catalog

number: ZO 334) and COX-2 (Abcam, Canada/US, catalog number: ab 15191), used at a dilution of 1:100 overnight at 4 °C. After washing, the sections were overlaid for 1 h with a biotin-conjugated secondary antibody using a HRP-kit (DakoCytomation, CA, USA, Biotinylated Link Universal HRP; catalog number: K0690) and visualized with 3'-3'-diaminobenzidine (DAB) as the chromogen. The slices were then weakly counter-stained with Harris' hematoxylin and mounted in entellan (Merck, catalog number: 1079610100).

2.3. Immunofluorescence

The cerebella were dissected and immersed in 15% sucrose overnight, followed by 30% sucrose for a second night (36 hours total). The specimens were then embedded in OCT-Tissue Tek compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and frozen in n-hexane (Dinâmica, São Paulo, SP, Brazil) with liquid nitrogen. Cryo-sections measuring 8 µm in thickness were permeabilized with 0.3% Triton X-100 and incubated for 1 h with blocking solution (3% BSA plus 0.2% Tween 20 in Tris buffered saline). Subsequently, the sections were incubated with antibodies for GFAP (DakoCytomation, catalog number: ZO 334) and Iba-1 (Wako, Osaka, Japan, catalog number: 019-19741) at a dilution of 1:100. Primary antibodies were incubated overnight and then incubated with polyclonal Cy3-conjugated secondary antibodies (Jackson, catalog number 705-165-147) against rabbit immunoglobulin (Sigma-Aldrich, catalog number F6257, 1:200) for 1 h. The slices were washed and mounted in fluorescent Prolong Gold Antifade medium (Life Technologies, catalog number: P36930) for observation under an inverted fluorescence microscope (Zeiss MicroImaging GmbH) equipped with a camera (Zeiss AxioCam MRM) and the Release 4.7.2 image analysis software. Stained areas were measured using the GIMP 2.6.11 software (GNU Image Manipulation Program software, CNET Networks, Inc. Australia).

2.4. Luxol fast-blue

The samples were dehydrated in a graded ethanol series, cleared in xylol and embedded in paraffin (Merck, Catalog numbers: 1071642504). Sections measuring 5 µm in thickness were cut on an RM 2035 microtome (Reichert S, Leica). Myelin was detected using luxol-fast blue (LFB) staining (Solvent Blue 38; Sigma-Aldrich). Sections were dewaxed and incubated overnight at 56 °C in 0.1% LFB solution. The next day, slides were cooled to 4 °C and stained sections were differentiated in Li₂CO₃ for 5 min and briefly in 70% ethanol, followed by counterstaining with eosin. The sections were observed under an inverted microscope (Zeiss MicroImaging GmbH) equipped with a camera (Zeiss AxioCam MRM) and Release 4.7.2 image analysis software (Zeiss). Stained areas were measured using the GIMP 2.6.11 software.

2.5. Western blotting

Cerebella were quickly dissected and each group was homogenized in an extraction cocktail (10 mM EDTA, Amresco, Solon, USA; 2 mM phenylmethane sulfonyl-fluoride, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaVO₄, 10 µg of aprotinin/ml and 100 mM Tris, pH 7.4 – Sigma-Aldrich). The samples were mixed and homogenized to form a pool from each group. Homogenates were centrifuged and frozen until use for immunoblotting. The proteins (40µg of total protein were used for all gels) were separated on 6.5% (IFN-γ), 10% (TNF-α, IL-1β, IL-2), 12% (GFAP) electrophoresis gel under reduced conditions and were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes (BioRad, catalog number 162-0115). After blocking, the membranes were incubated for 4 h with rabbit polyclonal antibody against GFAP (1:10,000 dilution, DakoCytomation, catalog number: ZO 334), COX-2 (1:1000 dilution, Abcam, catalog number: ab15191), TNF-α (1:1000 dilution, Peprotech, NJ, USA, catalog number: 500-P64), IFN-γ

(1:2500 dilution, Peprotech catalog number: 500P119), IL-1 β (1:2500 dilution, GenWay Biotech, Inc, CA/USA, catalog number: 18-732-292194) and IL-2 (1:2500 dilution, Peprotech, catalog number: 500-P111). Following washing, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (1:80,000 dilution, Sigma-Aldrich, catalog number: A9169), anti-mouse (1:1,000 dilution, Sigma-Aldrich, catalog number: A0168) or anti-goat secondary antibody (1:100,000 dilution, Sigma-Aldrich, catalog number: A5420). An enhanced chemiluminescence reagent (Super Signal, Pierce, catalog number: 34080) was used to make the labeled protein bands visible and the blots were developed on X-ray film (Fuji Medical, Kodak, catalog number: Z358487- 50EA). For quantification, the pixel density of each band was determined using the Image J 1.38 software (available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>; developed by Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA). For each protein investigated, the results were confirmed in three sets of experiments. Immunoblotting for β -actin was performed as a control for the above protein blots. After protein blot visualization with enhanced chemiluminescence, the protein antibodies were stripped from the membranes, which were reprobed with monoclonal anti- β -actin antibody (1:1,000 dilution, Sigma-Aldrich, catalog number A2228) and protein densitometry was then performed. The ratio of each protein/ β -actin studied was calculated and compared between groups.

2.6. Transmission electron microscopy

After anesthesia, the animals were sacrificed by transcardial perfusion with physiological saline (20 ml), followed by 40 ml of fixative – 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate acid (Sigma-Aldrich) buffer, pH 7.2. The cerebella were quickly dissected and post-fixed in the same fixative overnight. Next, cerebellum fragments were washed twice in the same buffer and post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich), 2 mM calcium chloride and 0.8% potassium ferricyanide (Sigma-Aldrich) in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in acetone and embedded in SPIN-PON resin (Embed 812 - Electron Microscopy Science - EMS, Washington, PA, USA). Resin polymerization was performed at 60 °C for 3 days [27]. Semithin sections (0.5 μ m in thickness) were placed on glass slides, stained with toluidin blue and used for the morphometric analysis of myelin. Ultrathin sections (70 nm in thickness) were placed on 300-mesh nickel grids, counterstained with 5% uranyl acetate (EMS) and lead citrate (Sigma-Aldrich) and examined using a FEI Morgani 268D transmission electron microscope.

2.7. Statistic analysis

The densitometric values of the immunoreactive bands (immunoblotting) were analyzed using the GraphPad Prism software package (San Diego, CA, USA). One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's and/or Tukey's post-test, were used to compare groups. The results were expressed as means $\pm$ S.E., when appropriate. A p-value < 0.05 indicated statistical significance.

3. Results

The clinical analysis revealed that cuprizone-treated animals had motor limitations, such as tremors and abnormal walking and posture. The group treated with 3 mg/Kg of sildenafil exhibited no clinical improvement, but the animals treated with 25 and 50 mg/Kg of sildenafil exhibited normal walking and posture as well as no tremors.

Clinical signs were observed and recorded by three observers. The control animals exhibited normal motor

function, exploring the environment normally. Posture and tail tonus were also normal. The cuprizone-treated mice exhibited arched (shortened) posture, low tail tonus and tremors, demonstrating difficulty in exploring the environment. The animals treated with 3 mg/Kg of sildenafil (concomitantly to cuprizone) exhibited the same signs observed in the animals having received cuprizone alone. However, the mice treated with 25 and 50 mg/Kg of sildenafil exhibited normal walking and capacity to explore the environment.

Cuprizone led to an increase in GFAP and Iba-1 expression in the cerebellum, indicating astrocyte activation (reactive gliosis) and microglial reaction. Sildenafil demonstrated a protective effect on cerebellar glial cells, as the cuprizone did not activate astrocytes and microglia in the animals having concomitantly received sildenafil.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of astrocyte activation (reactive gliosis), was physiologically expressed in the cerebellum of control animals. Treatment with 0.2% cuprizone for four weeks led to a significant increase in the expression of this protein. The animals having received sildenafil concomitantly to cuprizone treatment exhibited a dose-dependent decrease in GFAP levels in comparison to the animals treated with cuprizone alone (3 or 50 mg/Kg – $p < 0.001$; 25 mg/Kg – $p < 0.01$) (Fig. 1).

Immunohistochemistry and immunofluorescence for GFAP in the cerebellum revealed the expression and physiological location of this cytoskeletal intermediate filament in the control animals. GFAP labeling in the molecular layer of the cerebellum revealed long astrocytic processes with a typical arrangement perpendicular to the pia matter (Bergmann glia) (Fig. 2A-B). However, treatment with cuprizone induced astrogliosis, increasing the number of labeled astrocytic processes as well as the thickness of these processes (Fig. 2C-D). The group having received 3 mg/Kg of sildenafil exhibited a greater reduction in GFAP expression (Fig. 2E-F), whereas the animals treated with doses of 25 or 50 mg/Kg regained the physiological expression of GFAP (Fig. 2G-H-I-J). These results are in agreement with those obtained using western blotting.

Immunofluorescence for Iba-1 in the cerebellum revealed the physiological expression of this protein in the control animals, showing cells with few filaments, which were typically branched, thin and weakly labeled (Fig. 3A). Blood vessels exhibited no labeling of the surrounding microglia. On the other hand, cuprizone treatment induced the strong expression of Iba-1 (Fig. 3B), with longer, thicker and more intensely labeled microglia processes, exhibiting many surrounding blood vessels indicative of active perivascular microglia. The processes had lost their typical thin branched appearance, indicating that the cell phenotype acquired activated/phagocytic (amoeboid) characteristics. The administration of 3 mg/Kg sildenafil led to a reduction in Iba-1 expression (Fig. 3C), but did not change the phenotype of the activated microglia, while the doses of 25 and 50 mg/Kg (Fig. 3D-E) led to a decrease in the expression of this protein and the microglia exhibited thin, highly branched processes, typical of the latent state. However, only the dose of 25 mg/Kg of sildenafil led to a reduction in Iba-1 expression similar to that found in the control group, characterizing a resting microglial state.

Sildenafil demonstrated a strong anti-inflammatory effect, decreasing the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-1 β cytokines and COX-2

Immunoblotting for TNF- α and IFN- γ revealed basal expression in the control group. Cuprizone did not significantly enhance the expression of TNF- α or IFN- γ (Fig. 4). Treatment with sildenafil induced lower levels of TNF- α (Fig. 4A). Regarding IFN- γ expression, only the dose of 25 mg/Kg induced a significant reduction in comparison to the control and cuprizone groups (Fig. 4C). The doses of 3 mg/Kg and 50 mg/Kg had no significant

effect, although the blot bands revealed a tendency toward the decreased expression of IFN- γ (Fig. 4C).

Immunoblotting for cytokine IL-1 β and IL-2 revealed basal expression of these proteins in the control group (Fig. 5). No changes were detected in the expression of IL-2 and IL-1 β after cuprizone treatment (Fig. 5). Only the treatment with 25 mg/Kg of sildenafil led to a reduction in IL-2 expression in comparison to the control and cuprizone groups (Fig. 5A). Regarding IL-1 β expression, both 3 and 25 mg/Kg of sildenafil led to a significant reduction in the levels of this cytokine (Fig. 5C).

Immunoblotting for COX-2 revealed basal expression of this enzyme in the control group. Animals treated with cuprizone exhibited a significant increase in COX-2 expression, whereas treatment with 3 mg/Kg of sildenafil led to a reduction in COX-2 expression in comparison to the cuprizone group. Moreover, doses of 25 and 50 mg/Kg promoted an intense reduction in COX-2 levels in comparison to the control and cuprizone groups (Fig. 6A-B). Immunohistochemistry for COX-2 in the cerebellum confirmed the results obtained with immunoblotting. Weak labeling for COX-2 was located in the molecular layer in the control group (Fig. 7A). A significant increase in COX-2 was found after cuprizone treatment in comparison to the control group. (Fig. 7B). Following the administration of 3 mg/Kg of sildenafil, no reduction in COX-2 labeling was detected in comparison to the cuprizone group (Fig. 7C). However, doses of 25 and 50 mg/Kg led to a significant reduction in COX-2 expression to close to physiologic levels (Fig. 7D-E).

The cuprizone-treated animals exhibited demyelination and damage to the ultrastructure of the myelin sheath. Doses of 25 and 50 mg/Kg of sildenafil had a protective effect on the myelin ultrastructure and maintained normal thickness of the myelin sheath in the cuprizone demyelination model.

Standard LFB staining revealed a normal myelin structure in the control group (Fig. 8A). The animals treated with cuprizone exhibited a significant decrease in LFB staining, characterized by light areas indicative of myelin disorganization (Fig. 8B). Treatment with 3 mg/Kg of sildenafil did not alter LFB staining in relation to the cuprizone group (Fig. 8C). However, in the animals treated with 25 mg/Kg of sildenafil, myelin organization was characterized by oriented fibers and LFB staining was intense and uniform, similar to that found in the control group (Fig. 8D). In the animals treated with 50 mg/Kg of sildenafil, LFB staining was significantly stronger than in the cuprizone group, but the myelin aspect was irregular and displayed vacuoles (Fig. 8E).

The qualitative analyses of ultrathin cerebellum sections revealed normal myelin in the control group, with a typical lamellar pattern and preserved axons (Fig. 9A). The cuprizone-treated animals exhibited ultrastructural alterations in myelin and axons: collapsed myelin layers, reduced thickness or loss of myelin sheath, swollen axons and/or detached from the sheath (Fig. 9B,C,D). The animals treated with 25 mg/Kg of sildenafil exhibited a typical myelin lamellar arrangement, rare fibers with reduced myelin thickness and the absence of collapsed myelin (Fig. 9E), indicating that sildenafil treatment at this dose was efficient in protecting the myelin from cuprizone-induced injury. However, the animals treated with 50 mg/Kg of sildenafil exhibited frequent axons with a small diameter, a disproportionally thicker myelin sheath and altered lamellar structure (Fig. 9F).

4. Discussion

The present study evaluated the effects of sildenafil (Viagra®, Pfizer) on cerebellar neuroinflammation and demyelination in a multiple sclerosis (MS) mice model. Cerebellum has been reported as an important affected region of CNS in MS patients, showing severe white matter atrophy [28,29]. Despite the importance of this region, few studies

have been conducted in animal models to elucidate the role of the cerebellum in MS. In the cuprizone model, demyelination is present not only in the corpus callosum (region more frequently investigated, where the extent of demyelination could be scored more easily and consistently), but also in the cerebral and cerebellar cortex [30]. This model is, therefore, suitable for investigating the role of the cerebellum in MS. The sildenafil induces cGMP accumulation through PDE5 inhibition [31,32]. The tissue distribution of the PDE5 family is relatively restricted compared with other PDEs. Have been demonstrated the presence of PDE5 in cerebellum, kidney, pancreas, aortic smooth muscle cells, heart, placenta, skeletal muscle, and, to a much lesser extent, in other regions of the brain, liver and lungs. PDE5 as the major cGMP-hydrolyzing PDEs specifically and differentially expressed in cerebellum [33,34].

The pathophysiological relevance of inflammation-related regulation of astroglial cGMP formation is unknown at present, but recent evidence suggests a role for cGMP-mediated pathways in the regulation of the reactive astroglial phenotype. In the present study, cGMP accumulated by the PDE5 inhibitor sildenafil led to a reduction in GFAP expression in astrocytes and reduced the thickness of astrocytic processes. The data therefore demonstrate that cGMP accumulation by sildenafil is important to a reduction in the exacerbated astrocytic response in an MS model. Sharma et al.[35] suggest that astrocyte injury may be an important early step in the cascade of lesion formation in brain inflammation. Recent evidence obtained from cultured glial cells indicates that cGMP-mediated pathways regulate cytoskeleton dynamics, GFAP expression and motility in astrocytes as well as inflammatory gene expression in microglia, suggesting a role in the regulation of the reactive glial phenotype. cGMP regulates the glial inflammatory response *in vivo* following CNS damage caused by a focal cryoinjury on the cortex in rats. Treatment with the cGMP PDE inhibitor zaprinast (10 mg/Kg i.p.) notably enhanced astrogliosis, as evidenced by increased GFAP immunoreactivity and protein levels around the injury [36]. However, the present results demonstrate that cGMP accumulation by sildenafil administration led to a decrease in GFAP expression and astrocyte activation, especially at a dose of 3 mg/Kg. These differences between the PDE inhibitors zaprinast and sildenafil regarding their action in astrocytes may be related to specific PDE subtype inhibition and the dose administered. However, both zaprinast and sildenafil (present study) have been found to lead to a reduction in the number of round/ameboid lectin-positive cells and the expression of the activated microglia/macrophage markers Iba-1 and CD11b, thereby indicating decreased recruitment and activation of these cells.

Overproduction of nitrogen and oxygen free radicals by activated microglia is thought to be responsible for oxidative stress and greatly contribute to cell death, particularly neurons, in both acute tissue damage and chronic neurodegenerative disease [1]. According to Pifarre et al.[36] cGMP phosphodiesterase inhibition reduces oxidative stress and inflammatory response following focal brain injury. The regulation of the glial inflammatory response by cGMP may be part of the mechanisms underlying the neuroprotective effects of cGMP-PDE inhibitors reported in animal models of acute and chronic CNS disease [36]. This is corroborated by the findings of the present investigation, in which the administration of sildenafil led to a reduction in Iba-1 expression and promoted a resting microglial phenotype, suggesting that the regulation of the glial inflammatory response may contribute to the neuroprotective effects of cGMP-PDE inhibitors in brain injuries.

Intracellular cGMP reduces the production of cytokines, such as IFN- γ , TNF- α , and interleukins, and decreases oxidative stress, thereby modulating the inflammatory response [37]. Moreover, PDE inhibition appears to inhibit the inflammatory response in the microglia, reducing the damage to the myelin sheath [21]. Microglial cell are the major source of TNF- α , which exerts various effects on pathological CNS conditions, including edema formation after ischemia and demyelination. The release of TNF- α from the microglia can be suppressed by cyclic AMP-PDE inhibitors [38]. Wakita et al.[21] found that Ibudilast, a non-selective cAMP-PDE inhibitor that strongly inhibits type IV PDE, but weakly inhibits types I, II, III and V PDE), suppressed the secretion of TNF- α from microglia/macrophages

and ameliorated clinical signs and inflammatory cell infiltration in experimental allergic encephalomyelitis. According to the authors, myelin lesions were ameliorated with doses of 30 and 60 mg/Kg, but not at a low dose (10 mg/Kg). In the present study, basal levels of TNF- α and IFN- γ were detected in the control group, which is in agreement with previous studies and demonstrates physiologic levels of these cytokines [39]. Although it activated the microglia, as observed by Iba-1 expression, the cuprizone-demyelination model was unable to promote a significant release of TNF- α , likely due to the degree of inflammation induced. However, treatment with sildenafil at all doses studied here led to a reduction in TNF- α expression, confirming the findings of previous studies on PDE inhibitors [36]. Moreover, treatment with sildenafil significantly suppressed IFN- γ , IL-1 β and IL-2 in the cerebellum of MS mice.

Recent *in vitro* studies with an experimental autoimmune encephalitis (EAE) model found that 10 mg/Kg of sildenafil did not stimulate the proliferation or release of Th1/Th2 cytokines in splenocytes [40]. These divergent results may be related to the different demyelination models used, since cuprizone induces a non-peripheral immune system response, as well as to the dose and frequency of the sildenafil administration. However, recent studies report that sildenafil has anti-inflammatory effects on N9 microglial cells *in vitro*. Sildenafil was found to block I κ B α phosphorylation and degradation and inhibit the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase, suggesting that sildenafil exerts an *in vitro* anti-inflammatory effect in LPS-activated N9 microglial cells by blocking nuclear factor- κ B (NF- κ B) and MAPK activation [41]. Future studies by our group will investigate whether the anti-inflammatory effects of sildenafil in an MS mouse model occurs through the same pathways.

Some studies [13,42,43] point to a protective role of sildenafil in the myelin structure, including peripheral myelinated fibers; in diabetic mice, PDE5 expression in sciatic nerve tissue was found to be significantly upregulated, whereas the myelin sheath thickness, myelin basic protein (MBP) and subcutaneous nerve fibers were significantly reduced. Treatment with sildenafil significantly improved neurological function, concomitantly with increases in myelin sheath thickness, MBP levels and subcutaneous nerve fibers. These data indicate that the cGMP signaling pathway activated by sildenafil mediates the beneficial effects of sildenafil on diabetic peripheral neuropathy [42]. Protection against oligodendroglial apoptosis may be involved, since ibudilast has been shown to inhibit excitotoxicity in cultured oligodendroglia [44]. Sildenafil may have similar effect of inhibiting oligodendroglial apoptosis, since the cGMP analog 8-bromo-cyclic GMP protects differentiated oligodendrocytes from caspase-mediated death *in vitro* [43]. In the present study, the treatment with sildenafil was found to protect the myelin ultrastructure and maintained the normal thickness of the myelin sheath in a cuprizone demyelination model, indicating a neuroprotective effect.

The present results demonstrate that treatment with sildenafil led to a significant reduction in the release of COX-2 in a cuprizone demyelination model. Arachidonic acid (AA) metabolites are involved in certain neurological and neurodegenerative disorders with a neuroinflammatory component, such as stroke, Alzheimer's disease and MS [45,46,47]. The different classes of metabolites, such as prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and lipoxins, are released in the AA cascade by COX-1 and COX-2 enzymes [48]. These (eicosanoids) metabolites are potent mediators of inflammation [49].

In the experimental EAE MS-model, both mixed COX inhibitors, indomethacin or naproxen, and COX-2 selective inhibitors inhibit immune system activation, inflammation and demyelination in the spinal cord [36,50,51]. COX-2 protein expression is also increased in regions of active demyelination and co-expressed mostly with macrophages/microglia [52], oligodendrocytes and apoptosis [48]. However, it is not known whether COX-2 activity contributes to oligodendrocyte death.

Using the cuprizone model, Palumbo et al. recently investigated the activation of the AA cascade [40]. The authors found that both COX-1 and COX-2 gene expression were upregulated during exposure to cuprizone. Moreover,

the apoptosis of oligodendrocytes and a concomitant increase in the gene expression of COX-2 and PGE2-EP2 receptors preceded demyelination. COX-2 and EP2 receptors were expressed by oligodendrocytes, suggesting a causative role for the COX-2/EP2 pathway in the initiation of oligodendrocyte death and demyelination. COX-2 gene deletion or chronic treatment with the COX-2 selective inhibitor celecoxib or with the EP2 receptor antagonist AH6809 reduced cuprizone-induced oligodendrocyte apoptosis, the degree of demyelination and motor dysfunction. These data indicate that the COX-2 and PGE2 contribute to oligodendrocyte apoptosis [40]. It is possible that the reduction in COX-2 induced by sildenafil, demonstrated herein, contributes to the protection of oligodendrocytes and the prevention of demyelination.

In conclusion these results suggest that three possible mechanisms may be involved in the protective effects of sildenafil on cerebellar tissue: 1) cGMP accumulation induced by sildenafil may inhibit the release of cytotoxic substances, including pro-inflammatory cytokines and arachidonic acid metabolites; and/or 2) cGMP accumulation protects oligodendrocytes against apoptosis, maintaining the normal structure of myelin, 3) or both together. Thus, the oral administration of sildenafil may be suitable for individuals with MS and other neuroinflammatory/neurodegenerative diseases, providing additional benefits to current treatments.

Conflict of interest statement

The author(s) declared no conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Acknowledgments

The authors are grateful to Ms. Josineide Correia, Anne Gabrielle Vasconcelos and Maria da Conceição Carvalho for their excellent technical assistance, Denise Rocha Gomes for careful animal care, the Department of Pharmacology (FCM, UNICAMP) and CPqAM for the animal lodging facilities. The study was funded by grants from the Brazilian fostering agencies FACEPE (Processes n° DCR-0010-2.06/10 and APQ-0158-2.06/10) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Process n° 134257/2010-3). C.A.P. is an IB (CP-II) research fellow of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. We thank the English editing to Mr. Richard Boike.

References

- [1] Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8:57-69.
- [2] McGeer EG, McGeer PL. The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease. *CNS Drugs* 2007; 21:789-97.
- [3] Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 2008; 31:247-69.
- [4] Moharreggh-Khiabani D, Blank A, Skripuletz T, Miller E, Kotsiari A, Gudi V, Stangel M. Effects of Fumaric Acids on Cuprizone Induced Central Nervous System De- and Remyelination in the Mouse. *PLoS One* 2010; 5:117- 69.
- [5] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343:938-52.
- [6] Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple

sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338:278-85.

[7] Gao Z, Tsirka SE. Animal Models of MS Reveal Multiple Roles of Microglia in Disease Pathogenesis. *Neurol Res Int* 2011; 2011:383087.

[8] Kipp M, Norkus A, Krauspe B, Clarner T, Berger K, van der Valk P, Amor S, Beyer C. The hippocampal fimbria of cuprizone-treated animals as a structure for studying neuroprotection in multiple sclerosis. *Inflamm Res* 2011; 60:723-6.

[9] Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener* 2009; 4:47.

[10] Mrak RE, Griffin WS. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 2005; 26:349-54.

[11] Johnson KP, Brooks BR, Ford CC et al. Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. *Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. Mult Scler* 2000; 6:255-66.

[12] Reder AT, Ebers GC, Traboulsee A, Li D, Langdon D, Goodin DS, Bogumil T, Beckmann K, Konieczny A. Cross-sectional study assessing long-term safety of interferon-beta-1b for relapsing-remitting MS. *Neurology* 2010; 74:1877-85.

[13] Yoshioka A, Yamaya Y, Saiki S, Kanemoto M, Hirose G, Pleasure D. Cyclic GMP/cyclic GMP-dependent protein kinase system prevents excitotoxicity in an immortalized oligodendroglial cell line. *J Neurochem* 2000;74:633-40.

[14] Huizinga R, van der Star BJ, Kipp M, Jong R, Gerritsen W, Clarner T, Puentes F, Dijkstra CD, Van der Valk P, Amor S. Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis. *Glia* 2011; 60:422-31.

[15] Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 1995; 374:647-50.

[16] Pifarré P, Prado J, Baltrons MA, Giralt M, Gabarro P, Feinstein DL, Hidalgo J, Garcia A. Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 2011;121:499-508.

[17] Rosenberg GA: Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012. doi: [10.1038/jcbfm.2011.197](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.197).

[18] Puzzo D, Sapienza S, Arancio O, Palmeri A. Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008; 4:371-87.

[19] Prickaerts J, van Staveren WC, Sik A, Markerink-van Ittersum M, Niewöhner U, van der Staay FJ, Blokland A, de Vente J. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. *Neuroscience* 2002; 113:351-61.

[20] Boccia MM, Baratti CM CM. Effects of oxytocin and an oxytocin receptor antagonist on retention of a nose-poke habituation response in mice. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1999; 49:155-60.

[21] Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Lin JX, Ihara M, Ohtani R, Shibata M. Ibudilast protect against white matter damage under chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* 2003; 992:53-9.

[22] Manson SC, Burke G, Voets N, Palace J, Matthews PM. Presented at the 21st congress of the European Committee for the Treatment and Research in Multiple Sclerosis 2005; Poster no.237 Thessaloniki, Greece.

[23] Zhang L, Yu W, Schroedter I, Kong J, Vrontakis M. Galanin Transgenic Mice with Elevated Circulating Galanin Levels Alleviate Demyelination in a Cuprizone-Induced MS Mouse Model. *PLoS One* 2012;7:e33901.

[24] Silvestroff L, Bartucci S, Pasquini J, Franco P. Cuprizone-induced demyelination in the rat cerebral cortex and thyroid hormone effects on cortical remyelination. *Exp Neurol* 2012. doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.02.018.

- [25] Zhao L, Mason NA, Strange JW, Walker H, Wilkins MR. Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic peptide activity. *Circulation* 2003; 107:234-7.
- [26] Saraiva KL, Silva AK, Wanderley MI, De Araújo AA, De Souza JR, Peixoto CA. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion *Int J Exp Pathol* 2009;90:454-62.
- [27] Saraiva KL, Silva VA, Dias ES, Peixoto CA. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reprod Toxicol* 2006; 22:754-9.
- [28] Riccitelli G, Rocca MA, Pagani E, Martinelli V, Radaelli M, Falini A, Comi G, Filippi M. Mapping regional grey and white matter atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012. doi: 10.1177/1352458512439239.
- [29] Shields SD, Cheng X, Gasser A, Saab CY, Tyrrell L, Eastman EM, Iwata M, Zwinger PJ, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG. A channelopathy contributes to cerebellar dysfunction in a model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2012;71:186-94.
- [30] Skripuletz T, Bussmann JH, Gudi V, Koutsoudaki PN, Pul R, Moharregg-Khiabani D, Lindner M, Stangel M. Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain Pathol* 2010;20:301-12.
- [31] Zhang RL, Zhang Z, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M. Delayed treatment with Sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2006;83:1213-9.
- [32] Zhang YQ, Rodesch CK, Broadie K. Living synaptic vesicle marker: synaptotagmin-GFP. *Genesis* 2002; 34:142-5.
- [33] Kulkarni SK, Patil CS. Phosphodiesterase 5 enzyme and its inhibitors: update on pharmacological and therapeutical aspects. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004;26:789-99.
- [34] Shimizu-Albergine M, Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Wolfsgruber W, Hofmann F, Beavo JA. Individual cerebellar Purkinje cells express different cGMP phosphodiesterases (PDEs): in vivo phosphorylation of cGMP-specific PDE (PDE5) as an indicator of cGMP-dependent protein kinase (PKG) activation. *J Neurosci* 2003 ;23:6452-9.
- [35] Sharma R, Fischer MT, Bauer J, Felts PA, Smith KJ, Misu T, Fujihara K, Bradl M, Lassmann H. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathol* 2010;120:223-36.
- [36] Pifarré P, Prado J, Giralt M, Molinero A, Hidalgo J, Garcia A. Cyclic GMP phosphodiesterase inhibition alters the glial inflammatory response, reduces oxidative stress and cell death and increases angiogenesis following focal brain injury. *J Neurochem* 2010;112:807-17.
- [37] Khoshakhlagh P, Bahrololoumi-Shapourabadi M, Mohammadirad A, Ashtaral-Nakhai L, Minaie B, Abdollahi M: Beneficial effect of phosphodiesterase-5 inhibitor in experimental inflammatory bowel disease; molecular evidence for involvement of oxidative stress. *Toxicol Mech Methods* 2007, 17(5):281-8.
- [38] Suzumura A, Ito A, Yoshikawa M, Sawada M. Ibudilast suppresses TNF alpha production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS. *Brain Res* 1999;837:203-12.
- [39] da Cruz-Höfling MA, Rapôso C, Verinaud L, Zago GM. Neuroinflammation and astrocytic reaction in the course of *Phonetrutia nigriventer* (armed-spider) blood-brain barrier (BBB) opening. *Neurotoxicology* 2009;30:636-46.
- [40] Palumbo ML, Trincheri MF, Zorrilla-Zubilete MA, Schinder AF, Genaro AM. Glatiramer acetate reverts stress-induced alterations on adult neurogenesis and behavior. Involvement of Th1/Th2 balance. *Behav Brain Res* 2011; 218:121-28.
- [41] Zhao S, Zhang L, Lian G, Wang X, Zhang H, Yao X, Yang J, Wu C. Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-κB signaling pathways in N9 microglia. *Int Immunopharmacol* 2011;11: 468-74.
- [42] Wang L, Chopp M, Szalad A, Liu Z, Bolz M, Alvarez FM, Lu M, Zhang L, Cui Y, Zhang RL, Zhang ZG. Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice. *Neuroscience* 2011; 193:399-410.

- [43] Benamins JA, Nedelkoska L. Cyclic GMP-dependent pathways protect differentiated oligodendrocytes from multiple types of injury. *Neurochem Res* 2007; 32:321-9.
- [44] Wang X, Robinson PJ. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 1997; 68:443-56.
- [45] Abramovitz M, Adam M, Boie Y et al. Theutilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1483: 285-293.
- [46] Aid S, Bosetti F. Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca(2+)-independent phospholipase A(2) is altered in rat hippocampus during normal aging. *Brain Res Bull* 2007; 73:108-13.
- [47] Bilak M, Wu L, Wang Q, Haughey N, Conant K, St Hillaire C, Andreasson K. PGE2 receptors rescue motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2004; 56:240-8.
- [48] Carlson NG, Rojas MA, Black JD, Redd JW, Hille J, Hill KE, Rose J. Microglial inhibition of neuroprotection by antagonists of the EP1 prostaglandin E2 receptor. *J Neuroinflammation* 2009; 6:5.
- [49] Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* 2007; 101:577-99.
- [50] Muthian G, Raikwar HP, Johnson C, Rajasingh J, Kalgutkar A, Marnett LJ, Bright JJ. COX-2 inhibitors modulate IL-12 signaling through JAK-STAT pathway leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis. *J Clin Immunol* 2006; 26:73-85.
- [51] Neu IS, Metzger G, Zschocke J, Zelezny R, Mayatepek E. Leukotrienes in patients with clinically active multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002; 105:63-6.
- [52] Rose JW, Hill KE, Watt HE, Carlson NG. Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 2004; 149:40-9.

Figure Legends

Fig. 1 Immunoblot for protein GFAP. (A) The control group exhibited basal expression of the protein, while the cuprizone group exhibited a significant increase in GFAP levels. Treatment with 3 mg/kg of sildenafil induced a greater reduction in protein levels. At doses of 25 and 50 mg/kg, GFAP levels were closer to baseline. (B) All proteins studied by western blotting were normalized to β -actin. (C) For quantification, the pixel density of each band was determined using the Image J 1.38 software. Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA for parametric measurements, combined with Dunnett' and Tukey' post hoc tests. Probability values less than 0.05 were considered significant. (*) = $p < 0.05$ compared with control; (###) $p < 0.001$, compared with the cuprizone group.

Fig. 2 Immunohistochemistry (A, C, E, G, I) and immunofluorescence (Cy3 fluorochrome) (B, D, F, H, J) GFAP in the cerebellum. A and B show expression and physiological locations of intermediate filament in control animals. Treatment with cuprizone induced astrogliosis (C, D). The arrows show astrocytic processes positive for GFAP thicker after cuprizone treatment and similar to the control animals after treatment with sildenafil (E, F, G, H, I, J). Quantification (five arbitrarily selected areas per animal) was performed using the GIMP 2 image analysis software (graphic "K"). ** $p < 0.01$ compared with control, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with cuprizone. One-way ANOVA/Tukey; mean $\pm$ standard error. Bars = 20 μ m.

Fig. 3 Immunofluorescence (fluorochrome Cy3) for Iba-1 in the cerebellum. (A) Iba-1 physiological expression in

control animals. Blood vessels do not exhibit marked surrounding microglia (asterisks). Cuprizone-treated group exhibited shorter, thicker (amoeboid), intensely labeled microglial extensions (Fig. B). All groups treated with sildenafil exhibited decreased Iba-1 expression in comparison to the cuprizone group (C, D and E). Arrows indicate microglial labeling. Quantification (five areas arbitrarily selected per animal) was performed using the GIMP 2 image analysis software (F). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with cuprizone. One-way ANOVA/Tukey; mean $\pm$ standard error. Bars = 20 μ m.

Fig. 4 Immunoblot for TNF- α and interferon- γ cytokines. The control group exhibited basal expression of both cytokines. Cuprizone treatment did not alter the expression of TNF- α or IFN- γ . Treatment with sildenafil induced lower levels of TNF- α (4A). Only the dose of 25 mg/kg induced a significant reduction in IFN- γ expression in comparison to the control and cuprizone groups (4C), whereas doses of 3 mg/kg and 50 mg/kg had no significant effects (4C). For quantification, the pixel density of each band was determined using the Image J 1.3 software. Statistical comparisons were performed with one-way ANOVA for parametric measurements, combined with Tukey's and Dunnett's post hoc tests. ** $p < 0.01$ compared with the control, ## $p < 0.01$, compared with the cuprizone group.

Fig. 5 Immunoblot for IL-2 and IL- β cytokines. The control group exhibited basal expression of both cytokines. Cuprizone treatment did not affect the expression of IL-2 or IL-1 β . Only the treatment with 25 mg/kg of sildenafil reduced the IL-2 expression in comparison to the control and cuprizone groups (Fig. A). Both 3 and 25 mg/kg of sildenafil significantly reduced IL-1 β expression (Fig. C). For quantification, the pixel density of each band was determined using the Image J 1.38 software. These results are represented in graphs "B" and "D". Statistical comparisons were performed with one-way ANOVA for parametric measurements, combined with Tukey's and Dunnett's post hoc tests. ** $p < 0.05$ compared with the control, ## $p < 0.01$, compared with the cuprizone group.

Fig. 6 Immunoblot for COX-2. The control group exhibited basal expression of the protein. Cuprizone treatment significantly increased the expression of COX-2. On the other hand, treatment with 3 mg/kg sildenafil reduced the expression of COX-2 in comparison to the cuprizone group. Doses of 25 and 50 mg/kg promoted an intense reduction in the levels of this enzyme in comparison to the control and cuprizone groups (A-B). For quantification, the pixel density of each band was determined using the Image J 1.38 software. Statistical comparison was performed using one-way ANOVA for parametric measurements, combined with Dunnett's and Tukey's post hoc tests. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with control, # $P < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with the cuprizone group.

Fig. 7 Immunohistochemistry for COX-2 in the cerebellum. Locations and physiological expression of this enzyme in control animals (A). Cuprizone treatment induced a significant increase in the expression of COX-2 (B). The administration of sildenafil decreased the expression of COX-2 to levels close to the physiological state (C, D, E), except at a dose of 3 mg/kg. Arrows indicate the labeling of cellular bodies. Quantification (five arbitrarily selected areas per animal) was performed using the GIMP 2 image analysis software (F). *** $p < 0.001$ compared with control, ### $p < 0.001$ compared with the cuprizone group. One-way ANOVA/Tukey's post hoc test; mean $\pm$ standard error. Bars = 20 μ m.

Fig. 8 Luxol Fast Blue (LFB). The control group exhibited labeling intensity and pattern characteristic of normal myelination (A). LFB staining was lighter in the groups treated with cuprizone and 3 mg/kg of sildenafil (B, C). The

animals treated with 25 mg/kg of sildenafil exhibited uniform myelin organization and LFB staining intensity similar to the control group (D). The group treated with 50 mg/kg of sildenafil exhibited intense LFB staining (E), but the fibers were disorganized and many vacuoles were detected (E). Quantification (five arbitrarily selected areas) was performed using the GIMP 2 software (F). ** $p < 0.01$ compared with control, # # # $p < 0.001$ compared with the cuprizone group. One-way ANOVA/Tukey's post hoc test; mean $\pm$ standard error. Bar = 50 μm .

Fig. 9 Cerebellum ultrathin sections. A: Standard normal myelin (arrow) and intact axons (asterisk). B-D: after cuprizone treatment, the animals exhibited axons with reduced myelin sheath thickness (arrows), damaged axons, detached from their myelin sheaths (asterisks) or swollen (star) and tangles of collapsed myelin layers (white arrows). E: 25 mg/kg of sildenafil promoted the recovery the ultrastructural pattern of myelin, restoring normal thickness (arrow) and axon integrity (asterisk). Rare axons detached from their sheaths were observed in this treatment. F: After administration of 50 mg/kg of sildenafil, frequent fibers with a disproportionately thick myelin sheath were observed (white arrowheads).

Figure 1

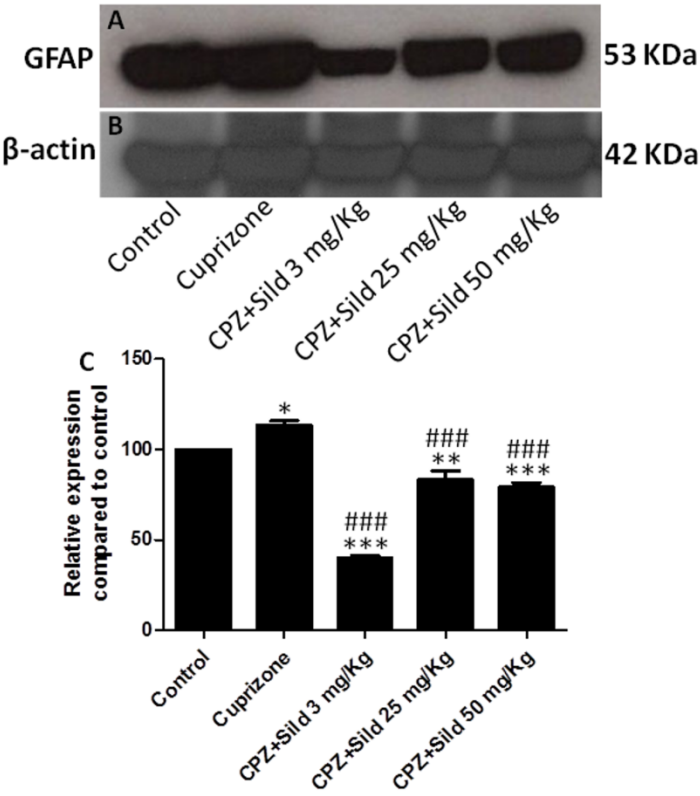


Figure 2

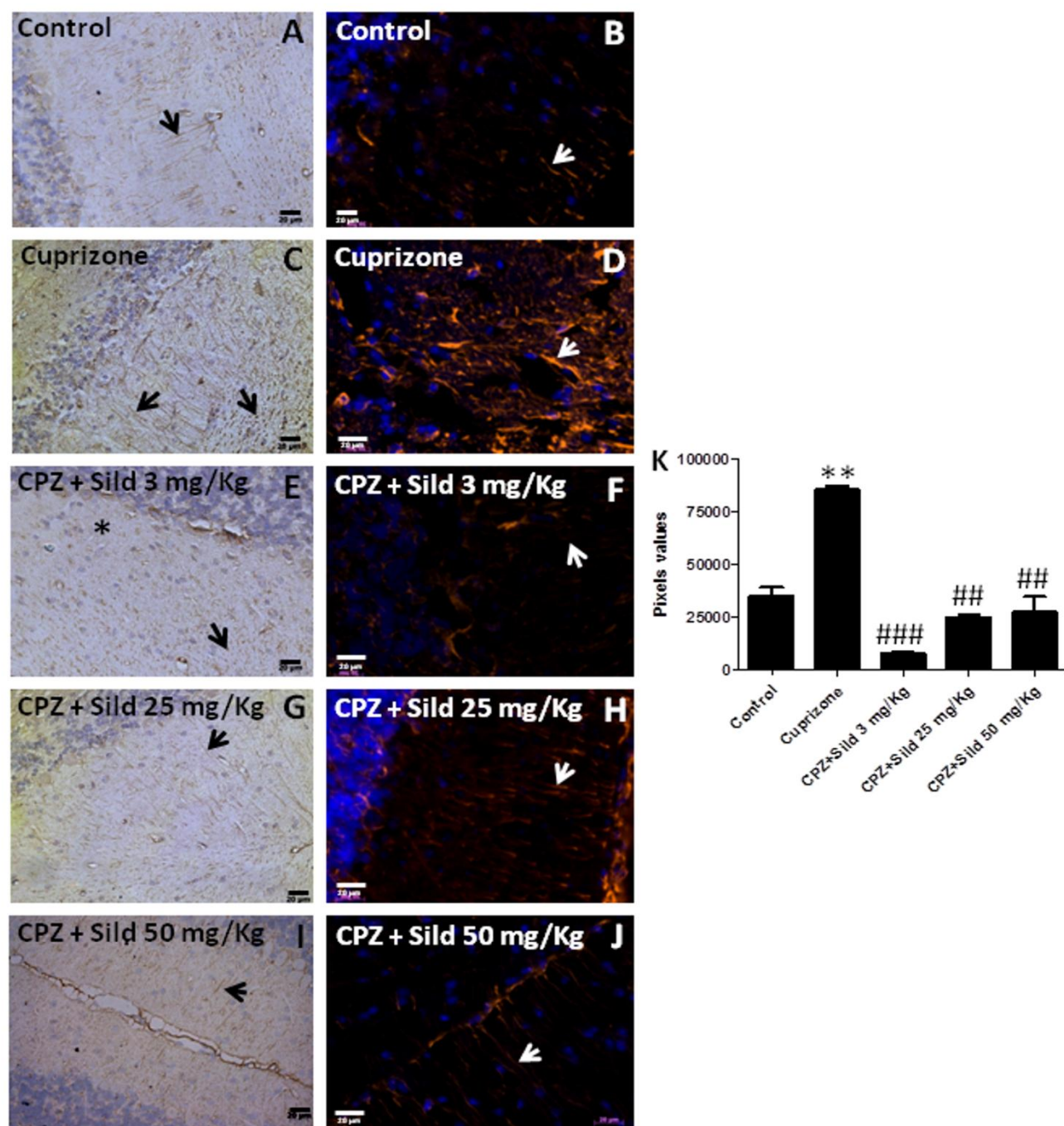


Figure 3

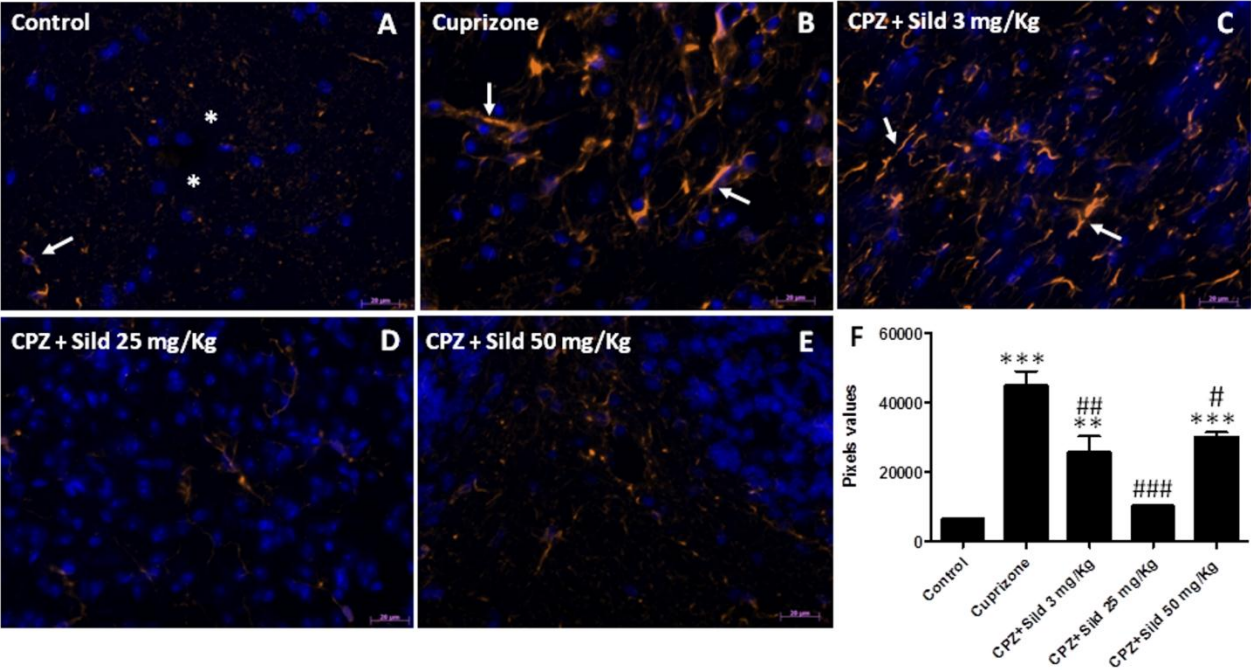


Figure 4

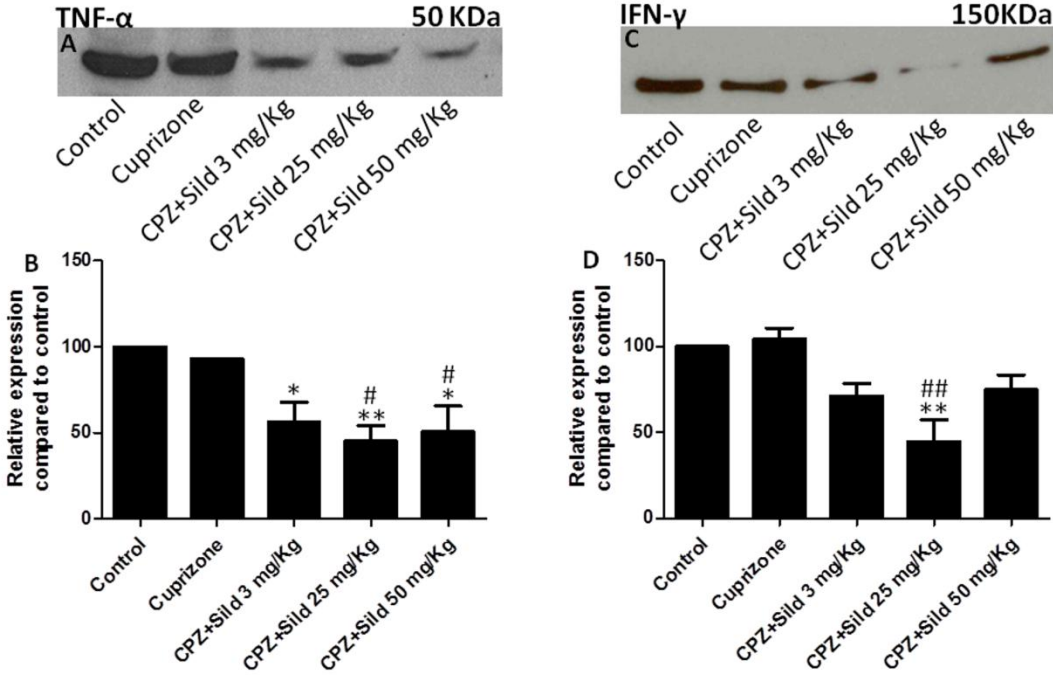


Figure 5

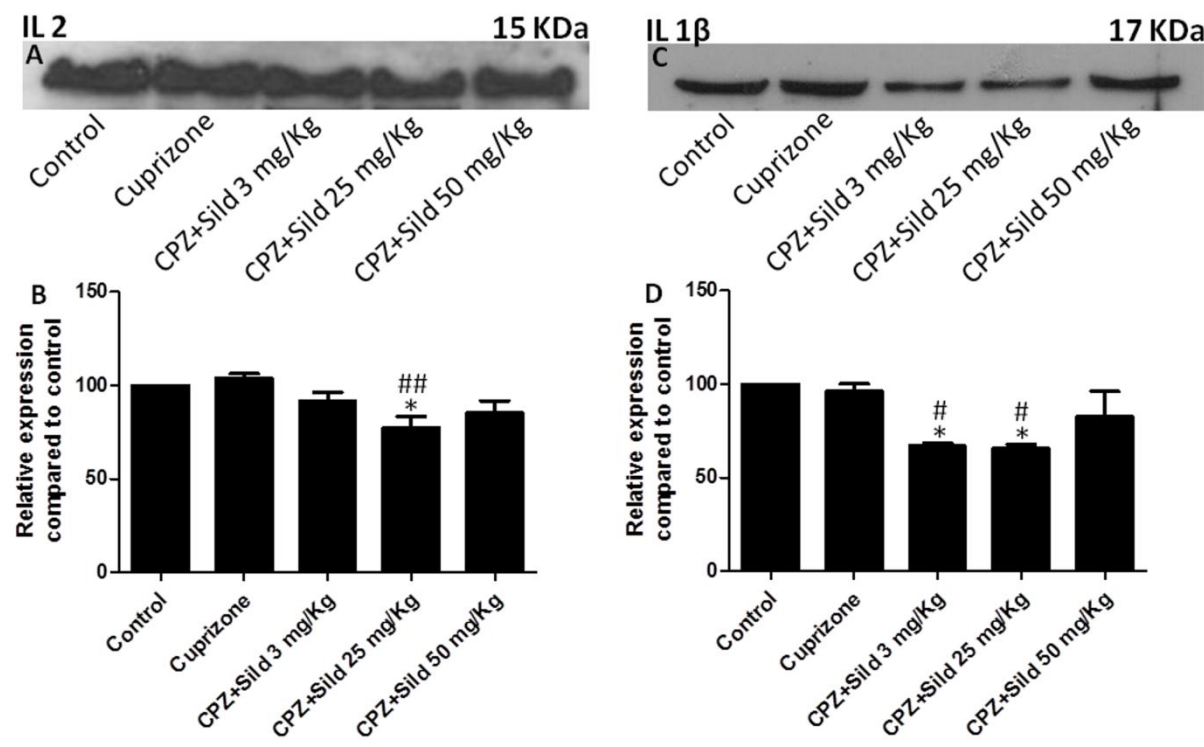


Figure 6

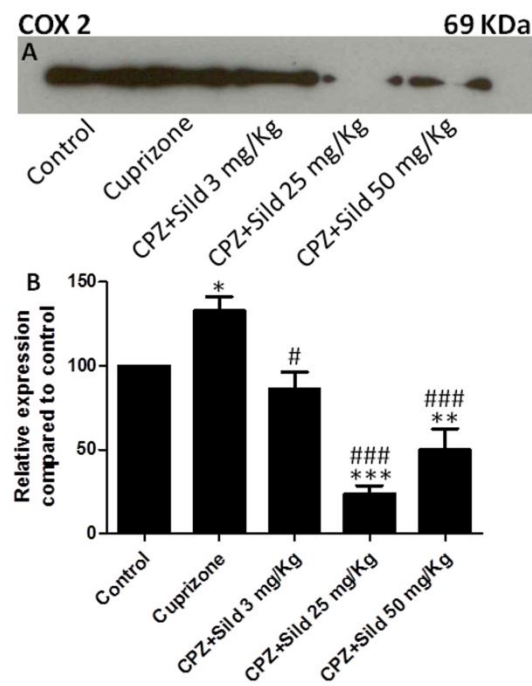


Figure 7

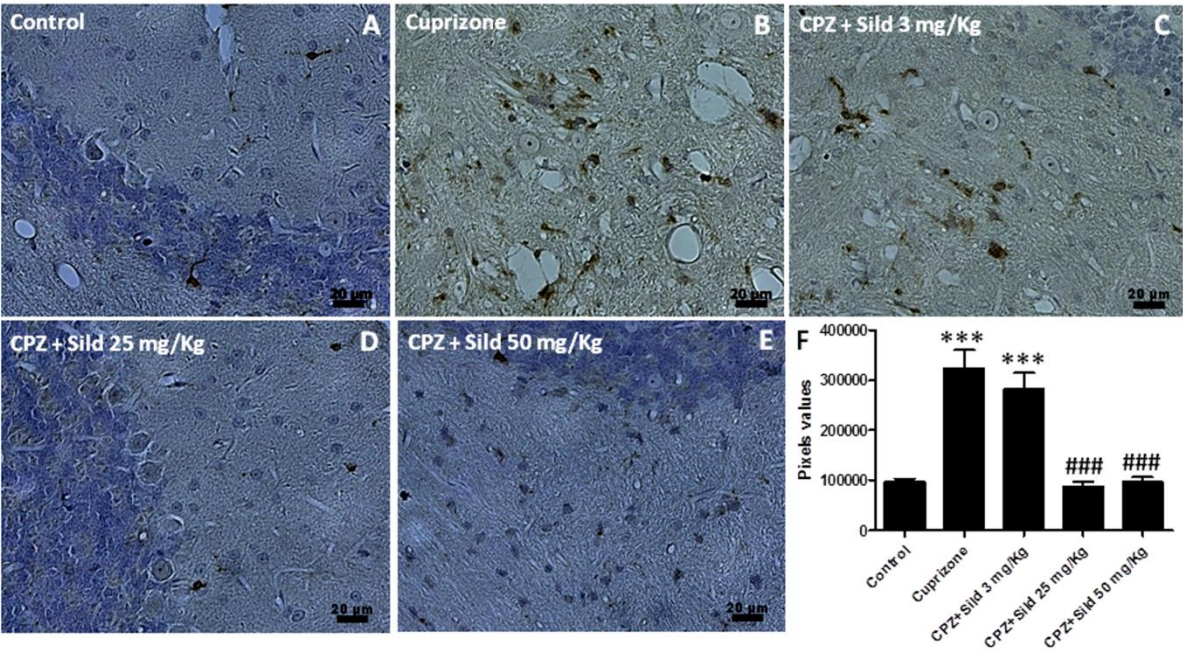


Figure 8

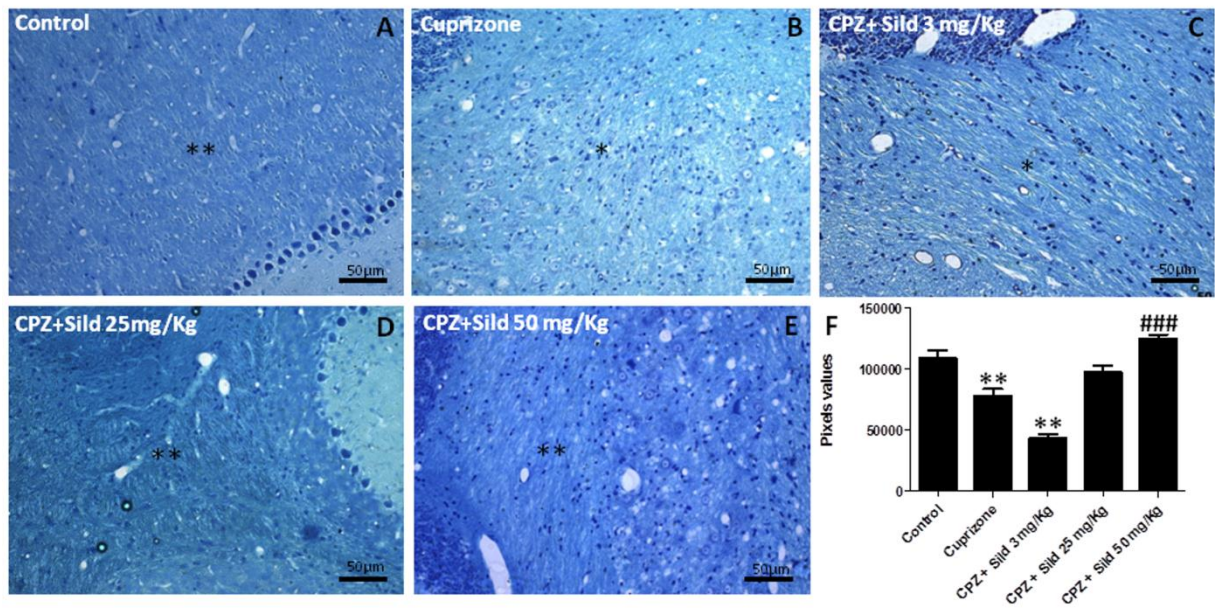
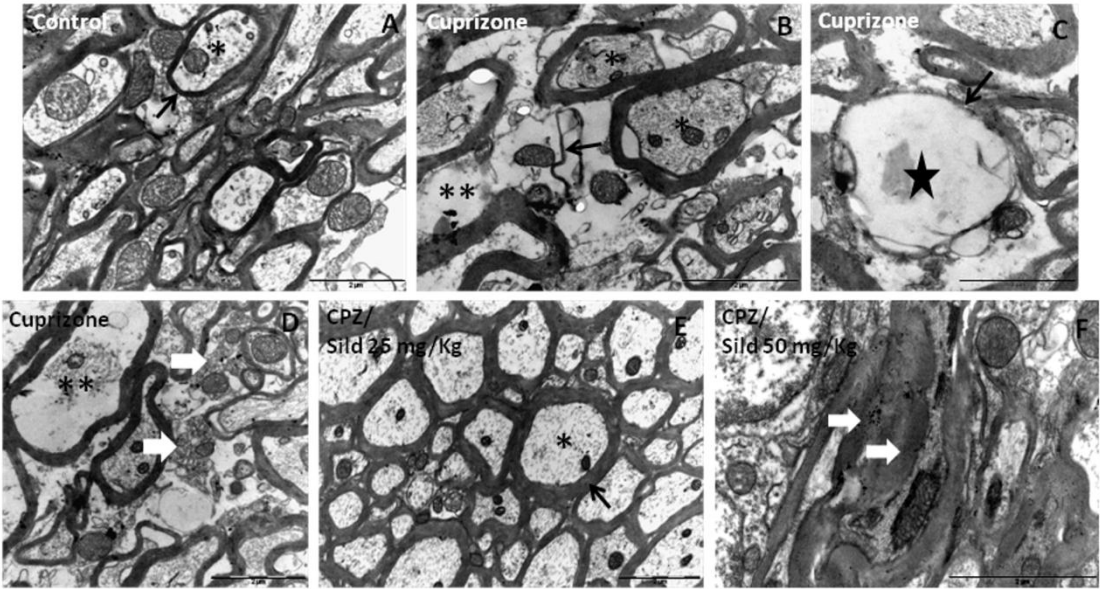


Figure 9



CAPÍTULO 2

**O papel do Sildenafil na via NO-GMPc nos efeitos da neuroinflamação e
mielinização**

O PAPEL DO SILDENAFIL NA VIA NO-GMPC NOS EFEITOS DA NEUROINFLAMAÇÃO E MIELINIZAÇÃO

METODOLOGIA

Grupos experimentais

Foram utilizados n = 5 animais (camundongos C57BL/6 *knockouts* para iNOS, machos, 7-10 semanas), por grupo, em cada uma das técnicas executadas. Todos os tratamentos tiveram duração de quatro semanas.

1. **Knockout para iNOS - Controle:** Grupo Controle - recebeu ração padrão e água.
2. **Knockout para iNOS – Cuprizona:** Recebeu Cuprizona (0,2%) na ração, para indução de desmielinização. Não recebeu tratamento com Sildenafil.
3. **Knockout para iNOS - Sildenafil 25 mg/Kg:** Recebeu Cuprizona (0,2%) na ração e Sildenafil 25 mg/Kg na água de beber.

Administração de Cuprizona (indução de desmielinização)

A Cuprizona (oxalic-bis-cyclohexylidenehydrazide) é um agente quelante de cobre, que causa intoxicação no SNC, afetando especificamente micróglia, astrócitos e oligodendrócitos. Esse agente causa, portanto, neuroinflamação de origem exclusivamente central (uma vez que a Cuprizona não ativa o sistema imune periférico) e desmielinização e tem sido usado como um modelo de estudo desses dois fenômenos. Aqui, o modelo de desmielinização por Cuprizona foi induzido em camundongos C57BL/6 *knockouts* para iNOS, machos, adultos jovens (7 semanas), sob responsabilidade do Biotério de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde foi obtido e realizado todo o experimento. Certificado de licença conferido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ): 10/2010. Os animais permaneceram em temperatura controlada (25-28°C), em um ciclo dia e noite de 12h. O procedimento foi realizado conforme descrito previamente por MORELL et al., 1998 e TAYLOR et al., 2010, brevemente: Foi fornecida aos animais (exceto os do grupo controle), durante 4 semanas, dieta suplementada com 0,2% de Cuprizona (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA) massa/massa, recém preparada.

Tratamento com Sildenafil e análise dos sinais clínicos – Estudo dos efeitos do Sildenafil na evolução clínica da EM

Concomitante ao início da dieta suplementada com Cuprizona, durante as quatro semanas, um grupo de animais recebeu Sildenafil na água de beber. A solução foi composta por água potável e Sildenafil (Viagra, Pfizer), na dose de 25 mg/Kg, e foi administrada por via oral, através de garrafas de água monitoradas diariamente. A concentração da droga na água foi ajustada para manutenção da dose (ZHAO et al., 2003). Os animais do grupo controle e Cuprizona receberam apenas água potável. Os animais foram observados diariamente por quatro semanas após o início da dieta com Cuprizona. Os sinais clínicos foram monitorados por três observadores e cuidadosamente registrados por anotações e filmagem. Após quatro semanas de esquema terapêutico, os animais foram anestesiados com injeção i.m. de ketamina (115mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e os cérebros e cerebelos retirados foram processados conforme as metodologias descritas abaixo. As carcaças dos animais foram autoclavadas e descartadas em lixo biológico destinado à incineração.

Imunofluorescência (IF)

Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados como descrito e perfundidos através do ventrículo esquerdo com paraformaldeído 4% em PBS (0,1 M, pH 7.4). Os cerebelos foram removidos, dissecados e imersos em sacarose 15%, overnight, e em sacarose 30% por mais uma noite. Então, as amostras foram incluídas em OCT-Tissue Tek e congeladas em n-hexano/nitrogênio líquido. Cortes de 10 µm, feitos em criostato, foram secos ao ar por 30 minutos e lavados três vezes com TBS 0,05 M. Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com leite desnatado a 3%, por 1 h à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados “overnight” com os anticorpos policlonais, produzidos em coelho: anti-GFAP (1:100, DakoCytomation, CA.,USA), e anti-Iba-1 (1:100, Wako Ltd, USA, cat#019-19741), diluídos em TBS 0,05 M, contendo 3% de leite desnatado. Após a incubação, os cortes foram lavados e incubados por 45 min com anticorpo secundário conjugado com Cy3 (1:250; Jackson Immunoresearch, cat. nº 711225152). As lâminas foram montadas com meio de montagem Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, cat# P36930) e cinco campos aleatórios por animal foram capturados usando o microscópio invertido Observer.Z1 (Zeiss MicroImaging GmbH), equipado com câmera acoplada (AxioCam MRm Zeiss) e com o programa de análise de imagem Release 4.7.2 (Zeiss).A análise quantitativa foi realizada medindo a intensidade da marcação (pixels) dos grupos controle e tratado, usando o programa GIMP 2 disponível no site: <http://www.baixaki.com.br/download/the-gimp.htm>.

Western Blot (WB)

O processamento para WB foi feito segundo CRUZ-HÖFLING et al (2009): decorrido o período de quatro semanas de tratamento, os animais foram anestesiados e sacrificados por decapitação. Os cerebelos foram rapidamente dissecados e homogeneizados em um coquetel de extração (10mM de EDTA, 2 mM de PMSF, 100 mM de NaF, 10mM de pirofosfato de sódio, 10 mM de NaVO₄, 10 mg de aprotinina/ml e 100mM de Tris, pH 7,4). As amostras dos 5 animais de cada grupo foram homogeneizadas em um único pool. Os homogenatos foram centrifugados à 3000g por 10 min e o sobrenadante foi coletado e estocado à -70°C até o momento do imunoblotting. As proteínas (40 µg) foram separadas em géis de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida, nas concentrações de 6,5% (IFN- γ), 12% (GFAP) e 14% (GSTpi), por eletroforese em gel sob condições reduzidas, e foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, CA, USA). Após bloqueio overnight à 4°C com 5% de leite desnatado em TBS-T (Tampão Tris salina 0,1% adicionado com Tween20, pH 7,4), as membranas foram incubadas à temperatura ambiente, por 4 h, com os anticorpos policlonais, produzidos em coelho, anti-GFAP – Proteína Glial Fibrilar Ácida (1:15000; DakoCytomation, CA, USA), anti-IFN- γ Interferon- γ (1:2500, Peprotech, Inc, NJ, USA, cat#500-P119) ou produzido em cabra, anti-GST3/GSTpi Glutathione S-Transferase (1:250; Abcam, US, Canadá, cat#ab 65977), diluídos em solução tampão TBS-T, contendo 3% de leite desnatado. Após lavagens em TBS-T, as membranas reagiram com anticorpo secundário anti-coelho ou anti-cabra IgG, conjugados com horseradish peroxidase (HRP) (ambos 1:100000 ou 1:80000, Sigma, cat# A6154 e A5420, respectivamente), diluídos em TBS-T com 1% de leite desnatado, por 1 h, à TA. Um agente revelador quimioluminescente (Luminol - super signal west pico chemiluminescent, Pierce) foi usado para tornar as bandas protéicas visíveis e os blots foram revelados em filme de raio-X (Fuji Medical, Kodak). Para quantificação, a densidade de pixels de cada banda foi determinada usando o programa ImageJ 1.38. Os resultados foram confirmados em triplicata.

Coloração Klüver-Barrera (Luxol Fast-Blue - LFB)

A mielinização do SNC foi avaliada pela coloração de Klüver-Barrera (WAKITA et al., 2003, ARNETT et al., 2010). Após anestesia, os animais foram imediatamente sacrificados por perfusão transcardíaca com 20 ml de tampão fosfato salina (PBS) 0,01 M, seguida por 30 ml de fixador (4% de paraformaldeído e 0,2 % de ácido pícrico em 0,1 M de tampão fosfato de sódio - PBS, pH 7,4). Os cerebelos foram lavados duas vezes em PBS pH 7.4 e fixados por 8 horas em Bouin (Ácido Pícrico saturado 1%, Formol a 40% e Ácido acético glacial), desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol, incluídos e emblocados em parafina purificada

(Paraplast, Sigma). A seguir, as amostras foram cortadas (5 μ m de espessura) em Micrótomo (Leica RM2125RT) e coradas. Brevemente, a coloração seguiu o seguinte protocolo: Desparafinização em xilol P.A a 40°C por 40 minutos seguido de mesmo tempo em temperatura ambiente com nova solução de xilol. Em seguida, os cortes foram hidratados em solução de álcool 90% e 70% por duas vezes (5 minutos cada etapa) e incubados em solução de corante Luxol Fast Blue 0,1% a 60°C overnight sobre câmara úmida. No dia seguinte, os cortes foram incubados por solução de carbonato de lítio por 1 minuto para clareamento dos cortes e em seguida desidratados em álcool 70% e corados com cresyl violeta por 1 minuto. Posteriormente os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em álcool e clareados em xilol P.A e montados com entellan (Merck, Catálogo número: 1079610100). Cinco campos escolhidos aleatoriamente foram capturados usando o microscópio invertido Observer.Z1 (Zeiss MicroImaging GmbH), equipado com câmera acoplada (AxioCam MRm Zeiss) e com o programa de análise de imagem Release 4.7.2 (Zeiss). A severidade das lesões na substância branca foi graduada através de quantificação de pixels, usando o programa GIMP 2. disponível no site <http://www.baixaki.com.br/download/the-gimp.htm>.

Análise estatística

Para as comparações estatísticas, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas paramétricas, associada aos testes de Dunnett e Tukey como testes a posteriori. Valores de probabilidade menor que 0,05 foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ o erro padrão, quando apropriado. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 5 (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

A observação dos sinais clínicos mostrou que os animais *knockout* para iNOS tratados com Cuprizona apresentaram tremores e postura anormal. O grupo tratado com Sildenafil 25 mg/Kg mostrou-se menos trêmulo e com postura próxima do normal.

Os animais *knockout* para iNOS do grupo controle apresentaram postura, tônus da calda e marcha normais. A Cuprizona, entretanto, promoveu tremores e alteração da postura (encurtamento). Os animais que receberam Sildenafil 25 mg/Kg simultaneamente à Cuprizona tiveram diminuição dos tremores e postura próxima do normal.

Cuprizona aumentou a expressão da proteína GFAP e Iba-1 no cerebelo dos animais *knockouts* para iNOS, indicando gliose reativa e ativação da micróglia. O tratamento com Sildenafil foi eficaz em reduzir a microgliose, diminuindo os níveis de Iba-1, entretanto não teve efeito em diminuir a expressão GFAP, tornando-a inclusive mais alta.

Os animais controle *knockout* para iNOS mostraram expressão basal de GFAP apresentando astrócitos com fenótipo normal, com prolongamentos numerosos e finos (Figura 2A). Após tratamento com Cuprizona, os prolongamentos astrocíticos ficaram mais espessos e abundantes e mais marcados para GFAP (Figura 2B). Os animais tratados com Sildenafil apresentaram aumento da marcação para GFAP, em relação ao grupo controle e Cuprizona, confirmando dados obtidos por WB (Figura 1). Entretanto, IF mostrou no grupo que recebeu Sildenafil, embora a marcação para GFAP seja elevada tal qual observada no grupo Cuprizona, houve redução da espessura dos prolongamentos dos astrócitos (Figura 2C). Os dados quantitativos para GFAP-WB estão apresentados no gráfico da figura 1B.

Estudo anterior do nosso grupo sobre a ação do Sildenafil em modelo de desmelinização-Cuprizona em utilizando animais C57BL/6 selvagens, mostraram que os animais tratados com Sildenafil (25 mg/kg) apresentaram redução significativa da marcação de GFAP quando comparado o grupo Cuprizona (NUNES et al., 2011). O presente estudo indica que a ação do Sildenafil sobre a proteína GFAP (e, portanto, sobre a ativação astrocitária) é dependente da via NO-GMPc, principalmente do NO produzido pela iNOS.

A marcação para Iba-1 revelou que os animais *knockouts* para iNOS apresentaram expressão basal da proteína e fenótipo aparentemente normal de micróglia vigilante (latente), com prolongamentos finos e longos e altamente ramificados (Figura 3A). Após ingestão de Cuprizona, os animais apresentaram micróglia altamente ativada, com prolongamentos espessos e curtos e corpo celular maior e mais fortemente marcado para Iba-1. Esse padrão de marcação reflete a forma amebóide adquirida pela micróglia ativada (Figura 3B). Nos animais que receberam Sildenafil,

simultaneamente à Cuprizona, a micróglia apresentou padrão de marcação para Iba-1 semelhante ao grupo controle, com pouca marcação no corpo celular, prolongamentos finos, longos e ramificados (Figura 3C).

NUNES et al.,(2011) utilizando o modelo de desmielinização-Cuprizona em animais C57BL/6 selvagens, demonstraram que os animais tratados com Sildenafil (25 mg/kg) apresentaram redução significativa da marcação de Iba-1 quando comparado com o grupo Cuprizona. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo com animais *knockout* para iNOS indicam que a ação do Sildenafil sobre a expressão de Iba-1 é independente de iNOS. Portanto, o Sildenafil teve papel protetor e preveniu a ativação da microglia, por uma via independente da iNOS. Esses dados são muito interessantes e demonstram que o mecanismo de ação do Sildenafil é tipo celular-dependente.

Sildenafil diminuiu a expressão de IFN- γ no cerebelo dos animais *knockout*, indicando que o efeito anti-neuroinflamatório do Sildenafil é, ao menos em parte, independente do NO produzido pela iNOS.

Os animais controle *knockouts* para iNOS apresentaram expressão basal de IFN- γ (Figura 5). Após tratamento com Cuprizona, os níveis de IFN- γ aumentaram significativamente em relação ao controle. Após administração de Sildenafil, a expressão de IFN- γ diminuiu significativamente em relação ao grupo Cuprizona, chegando ao nível basal visto nos controles. Os dados quantitativos do WB para IFN- γ estão apresentados no gráfico da figura 5(B).

Os resultados obtidos por NUNES et al., 2011 em modelo de desmielinização-Cuprizona utilizando animais C57BL/6 selvagens, mostraram que o Sildenafil (25mg/kg) promoveu redução da expressão de IFN- γ , apresentando portanto, um efeito anti-inflamatório. Os resultados do presente estudo utilizando animais Knockout para iNOS indicam que o efeito do Sildenafil em diminuir os níveis de IFN- γ foi independente do NO produzido pela iNOS.

Cuprizona reduziu os níveis de GSTpi, indicando uma depleção de oligodendrócitos. O tratamento com Sildenafil recuperou parcialmente a expressão fisiológica dessa proteína, sugerindo proteção de oligodendrócitos maduros e, portanto, da mielina.

O grupo iNOS^{-/-} controle apresentou expressão basal da proteína glutathione-S-transferase (GSTpi), uma isoenzima citosólica usada como marcador para oligodendrócitos maduros em cérebro de mamíferos. O tratamento com Cuprizona diminuiu significativamente a expressão de GSTpi, indicando que houve grande depleção de oligodendrócitos maduros e, portanto, dano à mielina. O tratamento com Sildenafil simultaneamente à Cuprizona manteve o nível de GSTpi significativamente maior do que aquele visto no grupo tratado apenas com Cuprizona. Entretanto, a

expressão dessa proteína ainda foi inferior ao controle. Esses dados demonstram que Sildenafil protegeu, embora parcialmente, os oligodendrócitos, mesmo na ausência do NO produzido pela iNOS. O WB para GSTpi está representado na Figura 4A e os dados quantitativos estão demonstrados no gráfico B, da mesma figura.

Os animais *knockouts* para iNOS (controle) apresentaram mielina com sinais de degeneração, tais como vacúolos e regiões de coloração LFB fraca. Os animais tratados com Cuprizona apresentaram em maior grau as mesmas alterações do grupo controle. Os animais tratados com Sildenafil 25 mg/Kg apresentaram mielina com coloração LFB mais densa e mais homogênea e vacúolos menores e em menor número.

Os animais *knockout* do grupo controle apresentaram alterações teciduais em regiões coradas para mielina pela coloração de Luxol Fast Blue (LFB). Foram vistos sinais de degeneração, tais como vacúolos grandes e numerosos e pequenas áreas heterogeneamente desmielinizadas (Figura 6A). Aparentemente, essas alterações não estavam presentes nas áreas não mielinizadas.

Após tratamento dos animais *knockouts* com Cuprizona, o tecido apresentou alterações mais intensas do que aquelas vistas nos animais controle *knockout*, tais como vacúolo maiores e pequenas áreas heterogeneamente desmielinizadas com regiões de mielina tortuosa e desorganizada (Figura 6B). O grupo que recebeu Sildenafil concomitantemente à Cuprizona apresentou as mesmas alterações degenerativas, entretanto em menores proporções. Menor número de vacúolos, mielina mais organizada e coloração mais homogênea (Figura 6C).

Estudos recentes sobre a ação do Sildenafil em modelo de desmielinização-Cuprizona em utilizando animais C57BL/6 selvagens, mostraram que os animais tratados com Sildenafil (25 mg/kg) apresentaram aspecto normal da mielina, fibras orientadas e ausência de vacúolos, promovendo portanto, a remielinização (NUNES et al., 2011). Os resultados obtidos com animais knockout para iNOS indicam que o efeito do Sildenafil promoveu uma remielinização na ausência da iNOS.

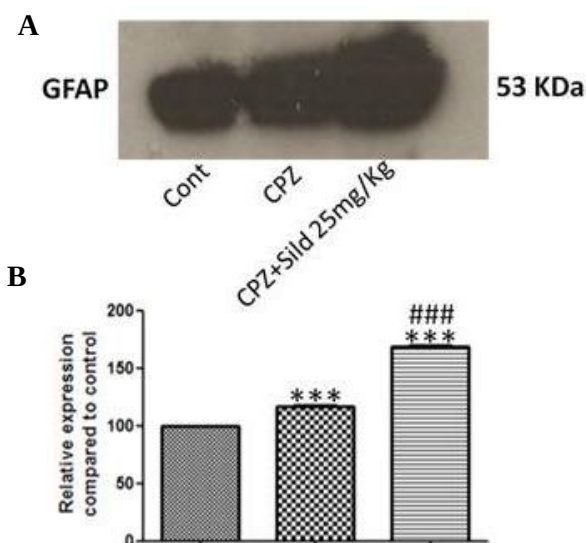


Figura 1: Imunoblot para a proteína GFAP em animais *knockout* para a enzima iNOS. Em “A”, observa-se o padrão de bandas marcadas no cerebelo dos grupos estudados. O grupo controle apresentou expressão basal da proteína, enquanto o grupo Cuprizona mostrou aumento significativo da marcação. O tratamentos com Sildenafil 25 mg/Kg aumentou significativamente a expressão de GFAP em relação aos grupos Controle e Cuprizona. Para quantificação, a densidade de pixels de cada banda foi determinada usando o programa ImageJ 1.38. Esses resultados estão representados no gráfico “B”. Para as comparações estatísticas, foi utilizada a análise de variância de uma via (one-way ANOVA) para medidas paramétricas, associada aos testes de Dunnett e Tukey como testes a posteriori. Valores de probabilidade menor que 0,05 foram considerados significantes. *** $p < 0.001$, comparando com o controle; ### $p < 0.001$, comparando com o grupo Cuprizona.

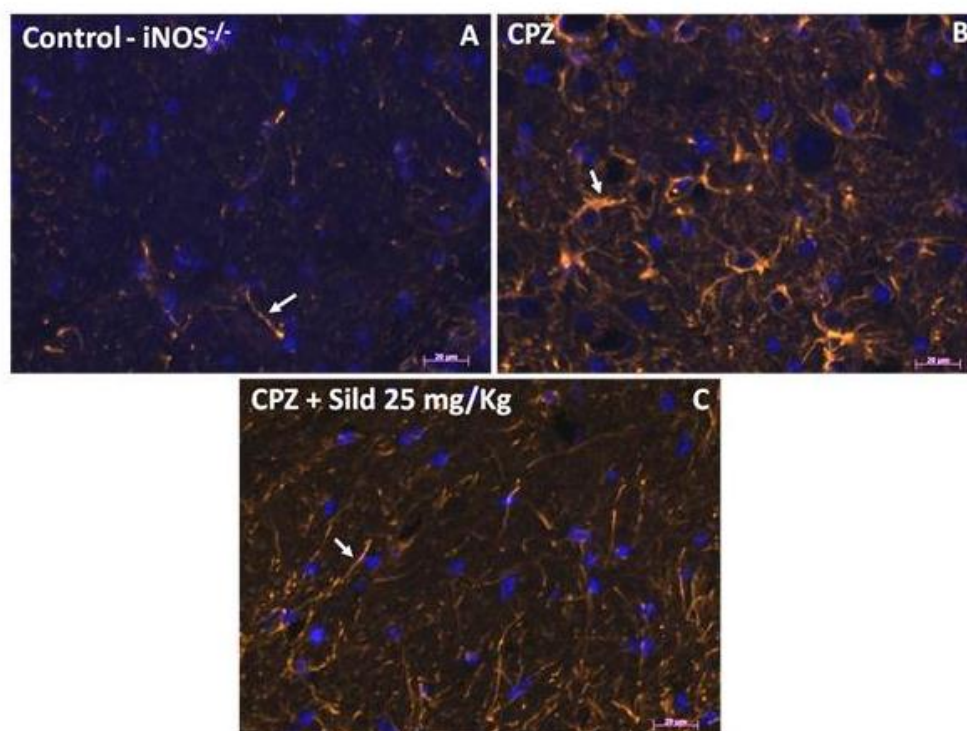


Figura 2: Imunofluorescência (fluorocromo Cy3) para GFAP, no cerebelo de animais knockouts para a enzima iNOS. “A” mostra expressão e localizações fisiológicas desse filamento intermediário, em animal controle. O tratamento com Cuprizona induziu astrogliose (B), com aumento do número de processos astrocitários marcados, bem como da espessura desses prolongamentos. A administração de Sildenafil não recuperou a expressão fisiológica de GFAP (C), que permaneceu maior que o controle. As setas mostram processos astrocíticos positivos para GFAP. Barras = 20 μm.

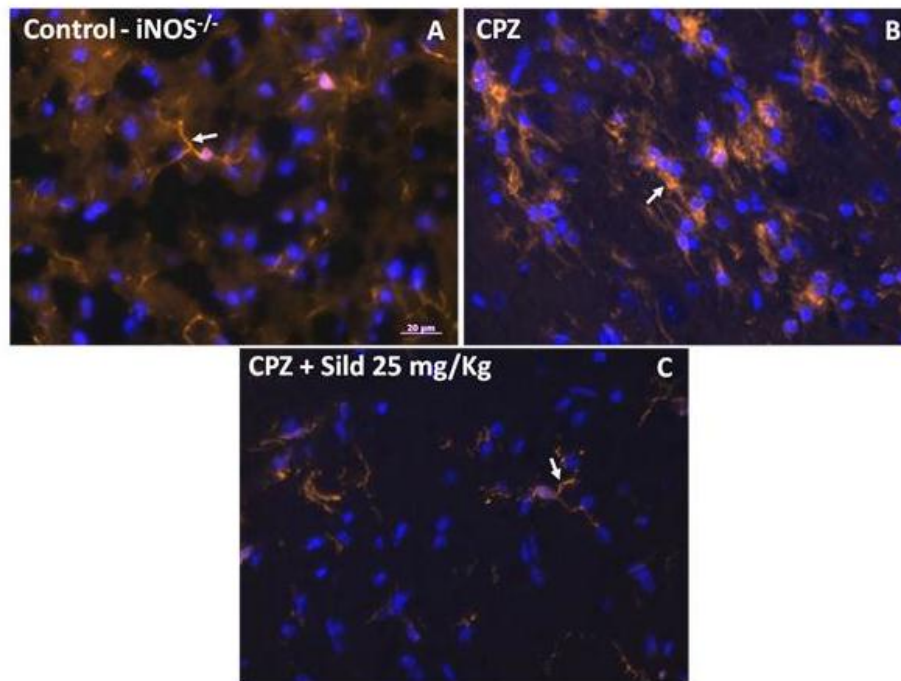


Figura 3: Imunofluorescência (fluorocromo Cy3) para Iba-1, no cerebelo de animais *knockout* para iNOS. “A” mostra expressão fisiológica dessa proteína nos animais controle. Há poucos filamentos, longos e ramificados, típico fenótipo latente da micróglia. O tratamento com Cuprizona induziu aumento na expressão de Iba-1 (B), que apresentaram prolongamentos mais espessos e menos ramificados, característico do fenótipo microglial ativado, com aspecto amebóide. A administração de Sildenafil simultaneamente à Cuprizona diminuiu a expressão de Iba-1 (C), em relação ao grupo Cuprizona. A micróglia aparentemente retornou ao seu estado latente, com prolongamentos finos e muito ramificados, indicando que o acúmulo de GMPc induzido pelo Sildenafil inibiu a ativação microglial pela Cuprizona. Esses dados indicam que a ação do Sildenafil sobre a micróglia foi independente do óxido nítrico produzido pela iNOS. As setas mostram prolongamentos microgliais positivos para Iba-1. Barras = 20 µm.

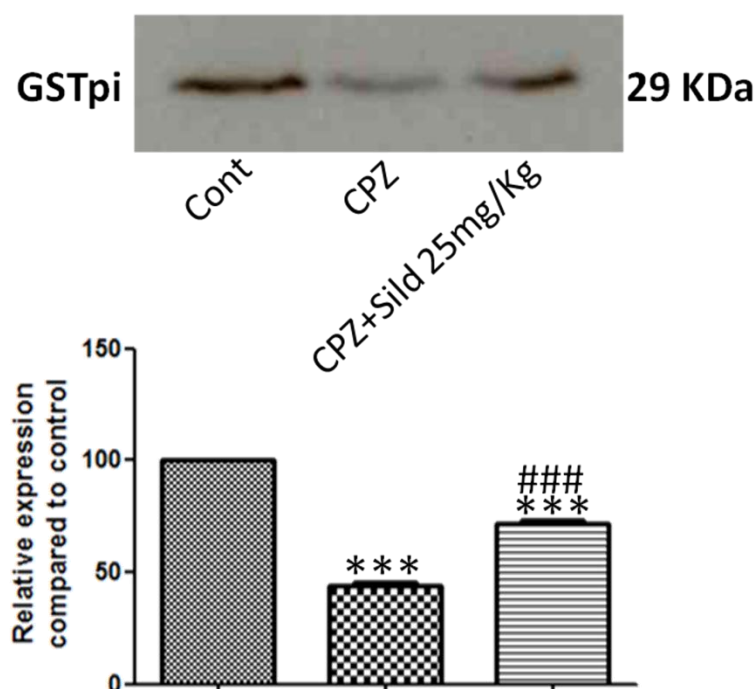


Figura 4: Imunoblot para a proteína GSTpi, um marcador de oligodendrócitos maduros, em cerebelo de camundongos *knockouts* para iNOS. Em “A”, observa-se o padrão de bandas marcadas no cerebelo dos grupos estudados. O grupo controle apresentou expressão basal da proteína. O tratamento com Cuprizona diminuiu significativamente a expressão de GSTpi, indicando que houve grande depleção de oligodendrócitos maduros e, portanto, dano à mielina. O tratamento com Sildenafil simultaneamente à Cuprizona manteve o nível de GSTpi significativamente maior do que aquele visto no grupo tratado apenas com Cuprizona. Entretanto, a expressão dessa proteína ainda foi inferior ao controle. Para quantificação, a densidade de pixels de cada banda foi determinada usando o programa ImageJ 1.38. Esses resultados estão representados no gráfico “B”. Para as comparações estatísticas, foi utilizada a análise de variância de uma via (one-way ANOVA) para medidas paramétricas, associada aos testes de Dunnett e Tukey como testes a posteriori. ***p < 0.001, comparando com o controle; ###p < 0.001, comparando com o grupo Cuprizona.

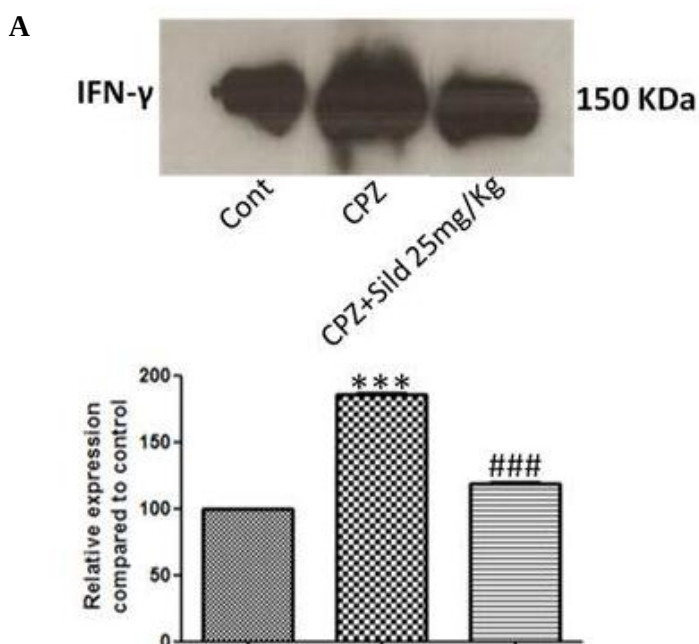


Figura 5: Imunoblot para a citocina Interferon- γ , em cerebelo de camundongos *knockouts* para iNOS. Em “A”, observa-se o padrão de bandas marcadas no cerebelo dos grupos estudados. O grupo controle apresentou expressão basal da citocina. O tratamento com Cuprizona aumentou significativamente a expressão de IFN- γ . O tratamento com Sildenafil reduziu significativamente a expressão de IFN- γ , comparando com o grupo Cuprizona, a níveis próximos do controle. Para quantificação, a densidade de pixels de cada banda foi determinada usando o programa ImageJ 1.38. Esses resultados estão representados no gráfico “B”. Para as comparações estatísticas, foi utilizada a análise de variância de uma via (one-way ANOVA) para medidas paramétricas, associada aos testes de Dunnett e Tukey como testes a posteriori. *** $p < 0.001$, comparando com o controle; ### $p < 0.001$, comparando com o grupo Cuprizona.

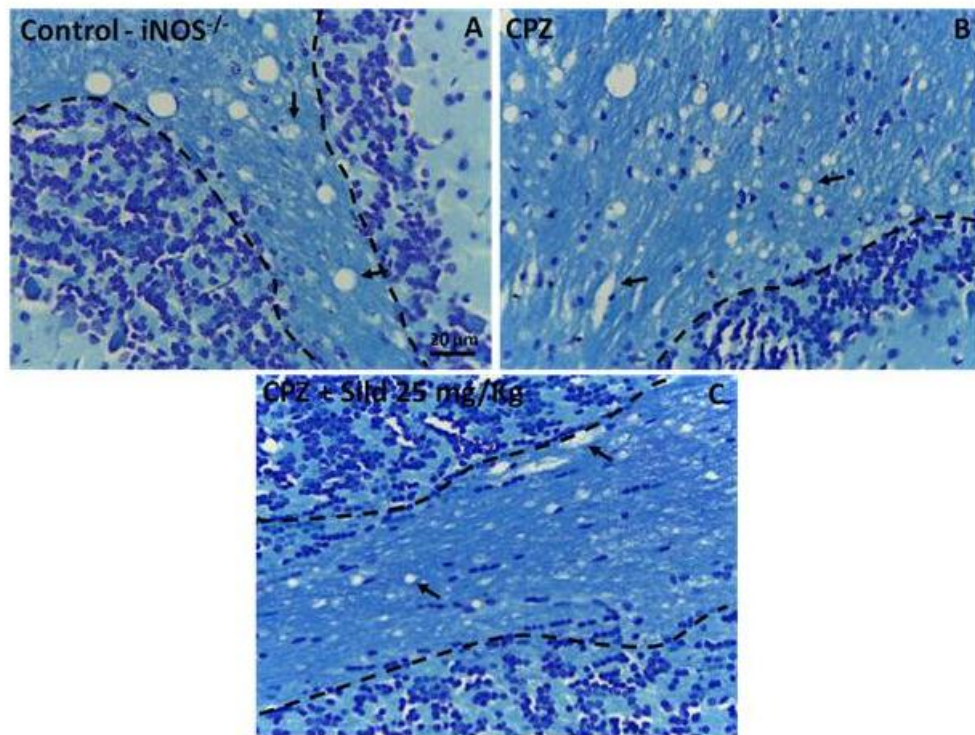


Figura 6: Luxol Fast Blue (LFB) em cortes de cerebelo (parafina) de camundongos *knockout* para iNOS. As áreas intensamente coradas em azul indicam regiões mielinizadas (região central entre as linhas pontilhadas). O grupo controle (A) apresentou mielina com vacúolos característicos de degeneração, que não são encontrados no animal selvagem (setas), indicando que a iNOS é uma enzima importante para a manutenção da integridade da mielina. “B” representa o grupo tratado com Cuprizona, que apresentou a mesma intensidade de coloração, porém com maior número de vacúolos, indicando degeneração mais intensa. A administração de Sildenafil concomitantemente à Cuprizona aumentou a intensidade da coloração e diminuiu o número e diâmetro dos vacúolos, indicando que o acúmulo de GMPc protegeu a mielina e que essa proteção foi independente do NO produzido pela iNOS. Barra = 20 µm.

CONCLUSÕES GERAIS

Sildenafil, em modelo de EM:

- 1. Diminuiu a gravidade e intensidade dos sinais clínicos observados nos animais com EM experimental;**
- 2. Apresentou potente efeito anti-inflamatório no SNC, reduzindo significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de COX-2 no cerebelo;**
- 3. Previu a ativação de astrócitos e micróglia, reduzindo a expressão de GFAP e Iba-1, respectivamente. A micróglia manteve seu fenótipo latente nos animais tratados com Sildenafil;**
- 4. Protegeu o SNC contra desmielinização, mantendo a homogeneidade, espessura, proporção em relação ao axônio e ultraestrutura normais da mielina;**
- 5. Apresentou efeito tipo-celular dependente; Nos astrócitos, o efeito foi dependente da presença do NO produzido pela iNOS, enquanto na micróglia e na mielina, o efeito protetor ocorreu independente da ausência da iNOS;**
- 6. É possível que, após ensaios clínicos bem conduzidos, Sildenafil seja uma droga compatível com a administração oral para pessoas com EM, proporcionando benefícios adicionais aos tratamentos atuais**

ANEXO

 **FIOCRUZ**
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado: **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 SOBRE A NEUROINFLAMAÇÃO, EM MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA (ENCEFALITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL) INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 WILD TYPE E KNOCKOUT PARA INOS."** protocolado sob o Nº 10/2010, coordenado pelo (a) pesquisador(a) **CHRISTINA ALVES PEIXOTO**, está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião de 28/04/2011. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até o mês de janeiro de 2013.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie - linhagem	Nº de Animais
Camundongo C57BL/6 SELVAGEM	
CAMUNDONGO C57BL/6 B6.129 P2- Nos2 (Knockout INOS)	90
	30
TOTAL	120

We certify that the project entitled **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 SOBRE A NEUROINFLAMAÇÃO, EM MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA (ENCEFALITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL) INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 WILD TYPE E KNOCKOUT PARA INOS."** (CEUA Protocol Nº 10/2010), coordinated by **CHRISTINA ALVES PEIXOTO** according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on April 28, 2011. In the present version this project is licensed and valid until January 2013.

Recife (PE, Brazil) May 23, 2011.


Drª Sheila Andrade de Oliveira
Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

 **Sheila Andrade de Oliveira, MSc, PhD**
Pesquisadora Adjunta de FIOCRUZ
Vice-Coordenadora do CEUA/CPqAM
Med. Supl. - 1840PS - Recife - Brasil

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.fiocruz.br/ceua