

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Rafael Cypriano Dutra**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> PARA AS  
CININAS NA MODULAÇÃO DA ENCEFALOMIELITE  
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Florianópolis

2012



Rafael Cypriano Dutra

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> PARA AS  
CININAS NA MODULAÇÃO DA ENCEFALOMIELITE  
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

D978a Dutra, Rafael Cypriano

Avaliação do papel dos receptores B1 e B2 para as cininas na modulação da encefalomielite autoimune experimental [tese] / Rafael Cypriano Dutra ; orientador, João Batista Calixto. - Florianópolis, SC, 2012.

150 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Imunidade. 3. Inflamação - Aspectos imunológicos. 4. Sistema nervoso - Doenças. 5. Esclerose múltipla. 6. Bradicininina. I. Calixto, João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

*Dedico este trabalho à minha mãe,  
Dalva Cypriano Attanazio  
por acreditar eternamente.*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, eterna fonte de iluminação e força, constante companhia em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe, por todo o apoio, incentivo, dedicação, paciência e principalmente pelo amor constante e diário. Esta obra é dedicada a você.

Ao meu amor e companheira Maíra, pelo apoio diário, incentivo constante e carinho eterno. Obrigado por sempre estar ao meu lado em todas as minhas decisões. Definitivamente o sucesso deste trabalho também é seu.

Ao meu irmão obrigado por sempre acreditar em mim e no meu potencial. À minha eterna madrinha, exemplo de persistência e coragem e ao meu primo Bruno, meus sinceros agradecimentos pelo apoio e credibilidade. Ao meu pai pelo apoio e incentivo durante esta importante fase da minha vida.

À família Matos, principalmente, Lara e Vitor pelas alegrias constantes.

Ao meu orientador, Professor João Batista Calixto, pelos ensinamentos, apoio, generosidade, além de acreditar na concretização deste projeto.

À família do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (LAFEX) da Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio constante e pelo inestimável auxílio na execução deste trabalho.

Agradeço a todos os meus verdadeiros e grandes amigos presentes e todos àqueles que mesmo distantes sempre estiveram ao meu lado.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade de Santa Catarina meus sinceros agradecimentos.

Ao CNPq, CAPES, FAPESC e PRONEX pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

Àqueles cujos nomes involuntariamente omitimos.





*“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”*

Confúcio ou Kung-Fu-Tzu



## RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica e progressiva, a qual desencadeia desmielinização no sistema nervoso central (SNC). Apesar dos grandes avanços observados nas últimas décadas quanto aos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e controle da EM, nenhum tratamento completamente seguro e eficaz surgiu até o presente momento. Estudos prévios demonstraram que os níveis de cininas, assim como a expressão dos seus respectivos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> encontram-se aumentados em pacientes com EM. No entanto, os mecanismos pelos quais os receptores de cininas regulam o desenvolvimento da EM não foram totalmente elucidados. Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo investigar o papel desempenhado pelos receptores de cininas na modulação da encefalomielite autoimune experimental (EAE), o modelo clássico de EM. A EAE foi induzida em camundongos C57BL/6 fêmeas com inoculação de glicoproteína de mielina do oligodendrócitos (MOG<sub>35-55</sub>), associado com adjuvante incompleto de Freund (CFA), suplementado com *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) H37Ra. Além disso, cada animal recebeu toxina *pertussis* por via intraperitoneal no dia 0 e dia 2. Neste modelo experimental, até o sétimo dia após a imunização, os linfócitos T reativos à MOG acumulam-se nos linfonodos inguinais. Entre os dias 10-12 surgem os primeiros sinais clínicos relacionados à doença, os quais atingem escore máximo entre os dias 15-18 após a imunização. Por esta razão durante o desenvolvimento deste trabalho definimos os dias 0-7 como a fase de indução da EAE, os dias 7-15 como fase aguda e por fim os dias 15-25 como a fase crônica da doença. O presente estudo demonstrou que o bloqueio dos receptores B<sub>1</sub>, tanto pelo tratamento farmacológico com o antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R - des-arg<sup>9</sup>-[leu<sup>8</sup>]-bradixinina (DALBK, 50 nmol/kg, i.p.) como em animais nocautes (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>), na fase de indução da EAE inibiu o desenvolvimento da doença por interferir com o surgimento da resposta imunológica periférica. De maneira significativa, o bloqueio do B<sub>1</sub>R inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE durante os 14 dias após a imunização. Além disso, a administração do antagonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub> (DALBK) durante a fase de indução inibiu a produção e a expressão de citocinas e de fatores de transcrição relacionados com os linfócitos Th1 e Th17, tanto em órgãos periféricos como no SNC. Durante a fase crônica da EAE, o tratamento com o antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R (DALBK, 50 nmol/kg, i.p.) foi capaz de reduzir

significativamente a progressão da doença. O tratamento com o antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R (DALBK), assim como o antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R (HOE-140) inibiu de maneira significativa a produção e a expressão de mediadores pró-inflamatórios em cultura primária de astrócitos estimulados com IFN- $\gamma$ . De maneira interessante, a administração do agonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub> (des-arg<sup>9</sup>-bradicinina, DABK, 300 nmol/kg, i.p.), durante a fase aguda da EAE bloqueou a instalação da doença e inibiu o aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) e conseqüentemente a neuroinflamação. Já o bloqueio do receptor B<sub>2</sub> (antagonista HOE-140, 150 nmol/kg, i.p. e animal nocaute B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) durante todos os períodos de análises causou inibição parcial no desenvolvimento da EAE. Em resumo, nossos resultados sugerem que os receptores de cininas, principalmente o subtipo B<sub>1</sub>R apresenta um papel dual na progressão da EAE, dependendo da fase de tratamento, através da inibição dos linfócitos T auto-reativos e das células gliais.

**Palavras-chave:** Autoimunidade. Neuroinflamação. Esclerose Múltipla. Desmielinização. Receptor B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de bradicinina.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is the most common progressive, inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Despite the great progress observed in the last decades on the mechanisms underlying the control of MS, no effective and safe therapies have emerged so far. The expression of kinins is increased in MS patients, but the underlying mechanisms by which the kinin receptor regulates MS development have not been elucidated. Here we investigated the role played by kinin receptors in the modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), analyzing the preventive and therapeutic effects of the selective blockade of kinin receptors in conjugation with gene deletion for both kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced in female C57BL/6 mice by immunization with MOG<sub>35-55</sub> peptide emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) and injected with pertussis toxin on day 0 and day 2. By using this protocol, MOG-reactive T cells begin to accumulate in regional lymph nodes on day 7, and mice begin to develop clinical signs between days 10 and 12, with a peak at around day 17. Therefore, we defined days 0 to 7 as the induction phase, days 7-15 as the acute phase and days 15-25 as the chronic phase of the disease. In this present study, we report that blockade of the B<sub>1</sub>R in the induction phase of EAE markedly suppressed its progression by interfering with the onset of the immune response. Furthermore, B<sub>1</sub>R antagonist suppressed the production/expression of antigen-specific Th1 and Th17 cytokines and transcription factors, both in the periphery and in the CNS. Notably, in the chronic phase of EAE, the blockade of B<sub>1</sub>R consistently impaired the clinical progression of EAE. In marked contrast, administration of the B<sub>1</sub>R agonist in the acute phase of EAE suppressed disease progression and inhibited the increase in permeability of the blood-brain barrier (BBB) and further CNS inflammation. Of note, blockade of the B<sub>2</sub>R only showed a moderate impact on all of the studied parameters of EAE progression. Our results strongly suggest that kinin receptors, mainly the B<sub>1</sub>R subtype, play a dual role in EAE progression depending on the phase of treatment through the lymphocytes and glial cell-dependent pathways.

**Keywords:** Autoimmunity. Neuroinflammation. Multiple sclerosis. Demyelination. Bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ilustração da área de desmielinização no SNC, reação crônica associada com o surgimento e manutenção dos sintomas da EM .....	2
<b>Figura 2</b> - Distribuição mundial da incidência de EM nos diferentes continentes.....	3
<b>Figura 3</b> - Ilustração esquemática das diferentes formas clínicas da EM.....	6
<b>Figura 4</b> - Diferentes componentes antigênicos da bainha de mielina.....	9
<b>Figura 5</b> - Fotografia ilustrativa dos animais durante o desenvolvimento da EAE .....	10
<b>Figura 6</b> - Patogênese da EAE .....	14
<b>Figura 7</b> - Imunopatogênese da EM, e os possíveis alvos terapêuticos.....	18
<b>Figura 8</b> - Esquema ilustrativo do sistema calcitréina-cinina.....	21
<b>Figura 9</b> - Imagem ilustrativa das vias de sinalização intracelular após a ativação dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> nas células endoteliais.....	23
<b>Figura 10</b> - Ilustração das três diferentes fases relacionadas com a gênese (fase de indução), desenvolvimento (fase aguda) e manutenção (fase crônica) da EAE durante o decurso temporal.....	30
<b>Figura 11</b> - Inibição ou a deleção dos receptores B <sub>1</sub> durante a fase de indução da EAE inibiu o desenvolvimento da doença.....	40
<b>Figura 12</b> - A deleção gênica ou o pré-tratamento dos animais com o antagonista do receptor B <sub>1</sub> preveniu o déficit locomotor induzido pela EAE.....	41
<b>Figura 13</b> - Inibição ou a deleção gênica dos receptores B <sub>1</sub> reduziu a perda de peso corporal induzida pela EAE.....	42
<b>Figura 14</b> - O bloqueio dos B <sub>1</sub> R e B <sub>2</sub> R inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE.....	43
<b>Figura 15</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R inibiu o número de células inflamatórias no SNC após a indução da EAE.....	45
<b>Figura 16</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R inibiu as áreas de desmielinização no SNC após a indução da EAE.....	46
<b>Figura 17</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R inibiu o número de células CD3 <sup>+</sup> no SNC após a indução da EAE.....	48
<b>Figura 18</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R inibiu a ativação de astrócitos no SNC após a indução da EAE.....	49
<b>Figura 19</b> - O bloqueio dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> preveniu a ativação do fator de transcrição CREB após a indução da EAE.....	50





<b>Figura 20</b> - O bloqueio do receptor B <sub>1</sub> reduziu a produção de citocinas encefalitogênicas nos linfonodos inguinais.....	52
<b>Figura 21</b> - O bloqueio do receptor B <sub>1</sub> inibiu a produção de citocinas encefalitogênicas nos linfonodos inguinais.....	53
<b>Figura 22</b> - O bloqueio dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> reduziu os níveis de ativação dos linfócitos CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> nos linfonodos inguinais .....	54
<b>Figura 23</b> - A deleção gênica dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> reduziu os níveis de ativação dos linfócitos CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> nos linfonodos inguinais.....	55
<b>Figura 24</b> - A deleção gênica do B <sub>1</sub> R diminuiu a proliferação de esplenócitos e linfócitos após a indução da EAE.....	56
<b>Figura 25</b> - O pré-tratamento com o antagonista seletivo do B <sub>1</sub> R inibiu os linfócitos CD4 <sup>+</sup> Th17 no SNC após a indução da EAE.....	57
<b>Figura 26</b> - O pré-tratamento com o antagonista seletivo do B <sub>1</sub> R inibiu os linfócitos CD4 <sup>+</sup> Th1 no SNC após a indução da EAE.....	58
<b>Figura 27</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R preveniu o aumento do RNAm para o B <sub>1</sub> R no SNC, após a indução da EAE.....	59
<b>Figura 28</b> - O tratamento terapêutico com o antagonista seletivo do B <sub>1</sub> R reduziu os sinais clínicos induzidos pela EAE.....	60
<b>Figura 29</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R após o surgimento dos sintomas da EAE inibiu o número de células inflamatórias no SNC.....	62
<b>Figura 30</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R durante a fase crônica da EAE preveniu a desmielinização no SNC, após a indução da EAE.....	63
<b>Figura 31</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R durante a fase crônica da EAE inibiu a ativação de astrócitos no SNC.....	64
<b>Figura 32</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R durante a fase crônica da EAE inibiu a ativação microglial no SNC.....	65
<b>Figura 33</b> - O bloqueio do B <sub>1</sub> R durante a fase crônica da EAE bloqueou a fosforilação do CREB no SNC.....	66
<b>Figura 34</b> - O tratamento terapêutico com o antagonista seletivo do B <sub>1</sub> R e do B <sub>2</sub> R restaurou a expressão do NF-H no SNC.....	67
<b>Figura 35</b> - Efeito da adição dos antagonistas seletivos para o B <sub>1</sub> R e B <sub>2</sub> R sobre a produção de citocinas/quimiocinas induzida por IFN- $\gamma$ em cultura primária de astrócitos.....	69
<b>Figura 36</b> - Efeito da adição dos antagonistas seletivos para o B <sub>1</sub> R e B <sub>2</sub> R sobre a expressão de mediadores pró-inflamatórios em cultura primária de astrócitos.....	70
<b>Figura 37</b> - A ativação do B <sub>1</sub> R durante a fase de indução da EAE não bloqueou a gênese da EAE.....	72



<b>Figura 38</b> - A ativação do B <sub>1</sub> R durante a fase crônica da EAE não inibiu a progressão da doença.....	73
<b>Figura 39</b> - A ativação do B <sub>1</sub> R durante a fase aguda da EAE bloqueou o desenvolvimento da EAE.....	74
<b>Figura 40</b> - O tratamento com o agonista DABK modulou a permeabilidade da BHE após a indução da EAE.....	75
<b>Figura 41</b> - O tratamento com o agonista DABK durante a fase aguda da EAE inibiu a ativação de linfócitos Th17 e Th1 no SNC.....	76
<b>Figura 42</b> - Representação esquemática dos possíveis mecanismos através dos quais as cininas atuando nos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> regulam a patofisiologia da EAE induzida por MOG <sub>35-55</sub> em camundongos C57BL/6.....	90



## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Sequência de peptídeos indutores da EAE de acordo com a espécie, assim como as respectivas linhagens susceptíveis.....	11
<b>Tabela 2</b> - Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento da EAE .....	29



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**EM** - Esclerose Múltipla

**EAE** - Encefalomielite autoimune experimental

**B<sub>1</sub>R** - Receptor de bradicinina tipo 1

**B<sub>2</sub>R** - Receptor de bradicinina tipo 2

**Th1** - Linfócitos T *helper* tipo 1

**Th2** - Linfócitos T *helper* tipo 2

**Th17** - Linfócitos T *helper* tipo 17

**Treg** - Linfócitos T regulatório

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**IFN** - Interferon

**IL** - Interleucina

**KC** - Quimiocina derivada de queratinócitos

**TNF-alfa** - Fator necrose tumoral alfa

**BHE** - Barreira hemato-encefálica

**MOG** - Proteína mielodendrítica (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

**BK** - Bradicinina

**DALBK** - Antagonista de receptor cininérgicos do tipo 1 (Des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-Bradicinina)

**DABK** - Agonista de receptor cininérgicos do tipo 1 (Des-Arg<sup>9</sup>-Bradicinina)

**HOE-140** - Antagonista de receptor cininérgicos do tipo 2 (D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5</sup>,D-Tic<sup>7</sup>,Oic<sup>8</sup>]-Bradicinina)

**GFAP** - Proteína glial fibrilar ácida

**CREB** - Proteína de ligação responsiva ao AMPc (*phospho-cyclic AMP response element binding protein*)

**CFA** - Adjuvante completo de Freud

**LN** - linfonodos

**APC** - Célula apresentadora de antígeno (*antigen-presenting cell*)

**CD** - Células dendríticas

**BDNF** - Fator de necrose derivado do cérebro

**NF-H** - Neurofilamento H

**VLA-4** - Integrina  $\alpha 4\beta 1$

**LCR** - Líquido cefalorraquidiano

**C57BL/6** - Linhagem de camundongos isogênicos

**dpi** - Dias pós-imunização

**i.p.** - Via intraperitoneal

**PBM** - Proteína básica da mielina

**SJL/J** - Linhagem de camundongos isogênicos





**MBP** - Proteína básica de mielina  
**MAG** - Glicoproteína associada à mielina  
**DAB** - 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahidroclorídrico  
**NO** - Óxido nítrico  
**COX-2** - Ciclooxygenase 2  
**p** - Significância estatística  
**DMEM** - Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco  
**DNA** - Ácido desoxirribonucléico  
**DNAc** - Ácido desoxirribonucléico complementar  
**DNBS** - Ácido dinitrobenzeno sulfônico  
**dNTPs** - Deoxinucleotídeos  
**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético  
**H&E** - Hematoxilina e eosina  
**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade  
**PMSF** - Fluoreto de fenilmetilsulfonila  
**RNA** - Ácido ribonucléico  
**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucléico mensageiro  
**RNasin** - Inibidor de RNase  
**RT-PCR** - Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
**TCR** - Receptores de células T  
**TGF** - Fator de crescimento transformante  
**TMB** - Tetrametilbenzidina  
**ANOVA** - Análise de variância  
**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologia e etiologia da EAE .....	1
1.2 Manifestações clínicas da EM .....	5
1.3 Modelo experimental de EM .....	7
1.4 Patogênese da EM, assim como do seu modelo experimental da EAE.....	12
1.5 Tratamentos da EM e os novos alvos terapêuticos .....	15
1.6 Sistema calicreína-cinina e seus receptores.....	19
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral .....	27
2.2 Objetivos específicos .....	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 Animais .....	28
3.2 Indução da EAE .....	28
3.3 Protocolos de tratamento .....	29
3.4 Experimentos comportamentais .....	30
3.4.1 Atividade locomotora .....	30
3.4.2 Hipernocicepção mecânica.....	31
3.5 Produção de citocinas em cultura de linfócitos e esplenócitos .....	31
3.6 Análise dos linfócitos por citometria de fluxo .....	32
3.7 Ensaio de proliferação celular .....	32
3.8 Análise histológica .....	32
3.9 Análise imunoistoquímica .....	33
3.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).....	35
3.10.1 Extração do RNA total .....	35
3.10.2 Confeção do DNA complementar (cDNA) .....	35
3.10.3 RT-PCR .....	36
3.11 Avaliação da permeabilidade da BHE .....	36
3.12 Cultura primária de astrócitos .....	36
3.13 Reagentes e Drogas .....	37
3.14 Análise estatística .....	38
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 A deleção genética e/ou antagonismo dos receptores B <sub>1</sub> das cininas na fase de indução da EAE inibe os sinais clínicos e o desenvolvimento da EAE.....	39



4.2 O bloqueio do receptor B <sub>1</sub> durante a fase de indução da EAE diminui a resposta neuroinflamatória e a perda de mielina no SNC .....	44
4.3 Papel das cininas sobre a expressão do fator de transcrição CREB na medula espinhal de camundongos com EAE.....	49
4.4 O bloqueio do B <sub>1</sub> R na fase de indução da EAE limita a expansão/ativação/proliferação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> assim como a produção de citocinas efetoras em tecidos linfóides periféricos.....	51
4.5 Inibição do B <sub>1</sub> R na fase de indução da EAE suprimiu os linfócitos Th17 e Th1 no SNC .....	56
4.6 O bloqueio do B <sub>1</sub> R após o início da doença reduziu os sinais clínicos e a neuroinflamação induzida pela EAE .....	59
4.7 Antagonistas dos B <sub>1</sub> R e B <sub>2</sub> R bloqueiam a liberação e a expressão de mediadores pró-inflamatórios pelos astrócitos .....	68
4.8 A ativação do B <sub>1</sub> R durante a fase aguda da EAE inibiu os sinais clínicos e a neuroinflamação no SNC: efeito <i>dual</i> do receptor B <sub>1</sub> de bradicina na EAE .....	70
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>6 SUMÁRIO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>108</b>



## 1 INTRODUÇÃO

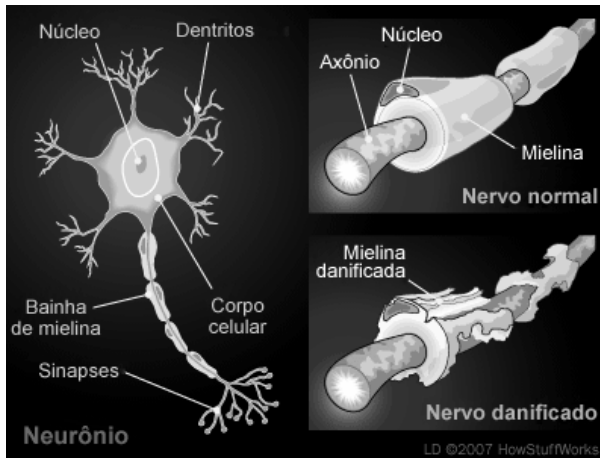
O termo “esclerose” deriva do termo grego que significa cicatrização ou rigidez, no caso da Esclerose Múltipla (EM) nas áreas onde foi destruída a mielina no SNC; enquanto que “múltipla” refere-se à condição do número de vezes que se repete a esclerose (Sospedra e Martin, 2005).

A EM foi descrita pela primeira vez em 1869 por Jean-Martin Charcot como sendo uma doença neurológica. Esta conclusão foi baseada, no fato de que células inflamatórias foram encontradas acumuladas na região perivascular, dentro da substância branca do cérebro e da medula espinhal dos pacientes com disfunção neurológica (Mcfarland e Martin, 2007). Por esta razão esta patologia foi denominada esclerose em placas disseminadas ou esclerose múltipla. Além disso, em 1878, Luis Ranvier descobriu a mielina, um revestimento multilamelar glicoprotéico que envolve o axônio no sistema nervoso central (SNC) por projeções de oligodendrócitos e no sistema nervoso periférico (SNP) pelas células de Schwann, e descreveu sua importância no mecanismo de transmissão de sinal do tipo saltatória ao longo dos neurônios (Waxman e Ritchie, 1985; Wingerchuk *et al.*, 2001).

Passados 125 anos da sua descrição original, atualmente a EM é definida como uma doença inflamatória crônica auto-imune, que causa neuroinflamação e desmielinização no SNC, de etiologia ainda indeterminada, com prevalência e incidência bastante variadas. A EM é ainda caracterizada pela destruição da bainha de mielina, perda de oligodendrócitos, gliose e lesão axonal, sendo que as lesões aparecem como placas desmielinizantes na substância branca (Al-Omaishi *et al.*, 1999) (Figura 1). Conseqüentemente, o processo de desmielinização produz alteração na condução saltatória das vias mielinizadas normais, determinando redução da densidade dos canais de sódio internodais com 5 a 10% de inibição na propagação do impulso nervoso (Scolding e Franklin, 1998).

### 1.1 Epidemiologia e etiologia da EM

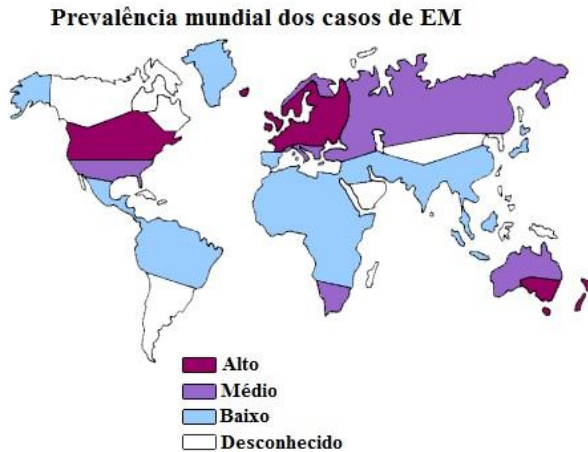
A EM acomete, principalmente, indivíduos brancos, na faixa etária entre 20 e 40 anos e com forte predomínio sobre o sexo feminino, afetando aproximadamente 2,5 milhões de indivíduos em todo o mundo (Lublin e Reingold, 1996).



**Figura 1. Ilustração da área de desmielinização no SNC, reação crônica associada com o surgimento e manutenção dos sintomas da EM.** Imagem adaptada de [http:// esclerosemultipla.wordpress.com](http://esclerosemultipla.wordpress.com)

Na distribuição mundial a incidência da EM está relacionada com determinados grupos étnicos bem como com a região específica do globo terrestre habitada por estes grupos, conforme ilustrado na Figura 2. Considera-se a distribuição mundial da EM praticamente delimitada em três áreas de frequência ou risco: *área de alto risco*: com prevalência maior de 30 casos para 100 mil habitantes, região esta que abrange o norte da Europa, norte dos EUA, sul do Canadá, Nova Zelândia e sul da Austrália. *Área de média frequência*, com 5 a 25 portadores para 100 mil habitantes e *área de baixa prevalência*, com menos de cinco casos para cada 100 mil habitantes, as quais abrangem a Ásia, América Latina e aproximadamente toda a África. No Brasil, calcula-se que a prevalência da doença seja da ordem de 10 casos para cada 100 mil habitantes, sendo desta forma considerado um país com média incidência de pacientes com EM (Morales *et al.*, 2006) (Figura 2).





**Figura 2. Distribuição mundial da incidência de EM nos diferentes continentes.** Imagem adaptada de <http://www.hendess.net/ms>

Segundo alguns estudos, os fatores genéticos contribuem na distribuição da EM e têm intrigado neurologistas há mais de um século. Embora um padrão de hereditariedade não tenha sido encontrado (Baranzini *et al.*, 2010), estudos epidemiológicos reforçam a hipótese de que existe uma maior susceptibilidade genética entre caucasianos, principalmente os do norte da Europa e entre seus descendentes americanos, canadenses, australianos, e sul-africanos. No entanto, a EM é considerada baixa nos povos asiáticos, assim como na população negra da África e nos países da América do Sul (Wingerchuk *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2006) (Figura 1). No entanto, um recente estudo realizou um mapeamento genético de gêmeos monozigóticos, nos quais um deles apresentava EM, enquanto que os outros dois irmãos não tinham a patologia. De forma bastante intrigante, os pesquisadores demonstram que os gêmeos não apresentam diferenças genéticas, epigenéticas ou do transcriptoma que pudesse explicar a discordância da doença. Por esta razão este trabalho apenas confirma a complexidade genética envolvida com o desenvolvimento da EM e corrobora com a idéia de que somente o mapeamento genético dos indivíduos não seja suficiente para diminuir a incidência de novos casos de EM.

Além dos fatores genéticos e epidemiológicos, fatores externos, os quais incluem infecções virais tais como *Epstein-Barr* (Wandinger *et al.*, 2000) e o vírus *Herpes do tipo 6* (Moore e Wolfson, 2002), ou

bacterianas como *Chlamydia pneumoniae* (Sriram *et al.*, 1999), estariam associadas ao surgimento dos primeiros sintomas. Dentre os fatores ambientais que potencialmente influenciam no desencadeamento da EM, destacam-se as variações hormonais, as quais podem contribuir ou mesmo induzir a doença (Coo e Aronson, 2004). O fato de que mulheres com EM superam o número de homens na proporção de 2:1 sugere que os hormônios femininos como, por exemplo, os níveis de progesterona ou até mesmo os níveis diminuídos de testosterona, tenham relevante importância neste contexto (Maccio *et al.*, 2005; Sospedra e Martin, 2005). Observações clínicas indicam que algumas doenças auto-imunes tais como EM e artrite reumatóide, freqüentemente sofrem remissão durante o período da gravidez, no entanto exacerbam ou têm seu início estabelecido no período pós-parto. Além disso, dados publicados sugerem que a administração oral de estriol (8 mg/dia) - um hormônio altamente produzido durante a gravidez - em mulheres não grávidas portadoras de EM, diminui a severidade da doença (Sicotte *et al.*, 2002), o que poderia facilmente explicar os diferentes dados epidemiológicos entre os gêneros. No entanto, neste estudo os autores não investigaram o efeito deste hormônio em pacientes masculino portadores de EM.

Outra explicação mais recente para o surgimento da EM, é que uma diminuição a exposição ao sol pode ser um fator crítico nos níveis de vitamina D, a qual está diretamente associada com a incidência da patologia (Hart *et al.*, 2010). Além disso, evidências epidemiológicas, estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que o baixo nível sérico de vitamina D está diretamente relacionado a um aumento da incidência de EM, e que uma dieta suplementada com vitamina D pode prevenir o surgimento e/ou agravamento da EM. No entanto, o nível sérico adequado de vitamina D em pacientes com EM não é claro, porém diversos investigadores têm proposto que as concentrações séricas de vitamina D entre 75 e 100 nmol/L (30-40 ng/mL) são ideais para alcançar uma boa evolução clínica (Summerday *et al.*, 2011). Estudos mais recentes demonstraram que a insuficiência e/ou deficiência nas concentrações fisiológicas de vitamina D parece afetar a diferenciação das células T, as quais podem alterar as respostas imunes celulares contra antígenos e patógenos associados com a etiologia da EM. A vitamina D também participa na ativação/diferenciação das células B, as quais têm sido amplamente implicadas nos processos neuroinflamatórios (Sellner *et al.*, 2011).

## 1.2. Manifestações clínicas da EM

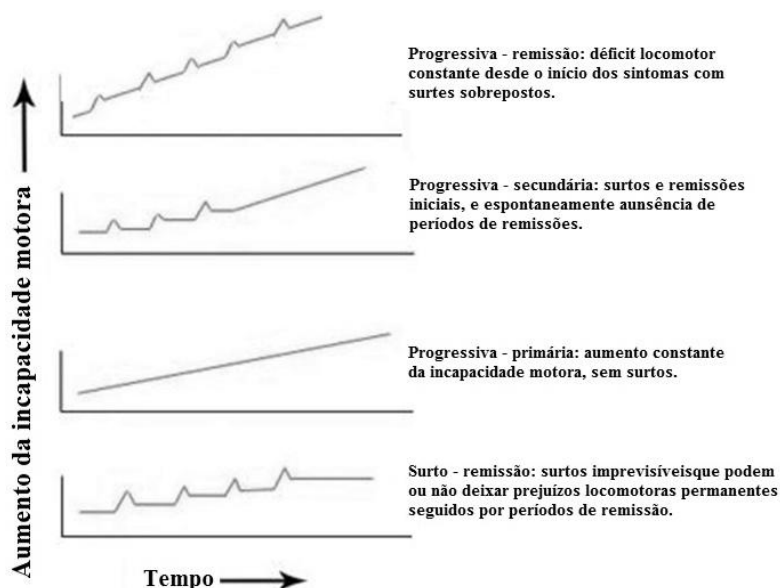
A EM é uma doença complexa, caracterizada pelo desenvolvimento de inflamação em áreas da substância branca no SNC, seguido por um processo de destruição imunológica da bainha de mielina e redução dos oligodendrócitos (Goverman, 2009). Clinicamente, os sintomas da EM começam entre os 20 e 40 anos de idade em 70% dos indivíduos, sendo incomum iniciar antes dos 15 ou depois dos 50 anos de idade. Desta forma a EM é caracterizada como uma patologia neurológica que afeta pacientes jovens diferentemente dos principais distúrbios neurológicos que afetam principalmente os pacientes idosos como, Doença de Alzheimer e Mal de Parkinson (Glass *et al.*, 2010).

A perda de mielina interfere na transmissão dos impulsos nervosos produzindo os sintomas típicos da doença como, por exemplo, parestesias (dormências, formigamentos), fraqueza dos membros inferiores, dificuldade para caminhar, neurite óptica (turvação visual), visão dupla, perda de coordenação motora, desequilíbrio, tonturas, vertigem, tremores, dor, disfunções sexuais, distúrbios esfinterianos (alterações no controle da urina e fezes) e fadiga. Demência (distúrbio mais grave da memória e do comportamento), afasia (dificuldade de se expressar), convulsões, movimentos involuntários dos membros, cefaléia e dificuldade na deglutição, são menos comuns (Bjartmar e Trapp, 2001; Hafler, 2004; Kawakami *et al.*, 2005; Goverman, 2009).

Dados recentes demonstram que aproximadamente 65% dos pacientes com EM apresentam além dos sintomas motores, considerável déficit cognitivo, os quais incluem perda de memória e déficit de atenção, quase sempre associados à depressão e ansiedade (Engel *et al.*, 2007). Estes sintomas afetam fortemente a habilidade dos pacientes em trabalhar, assim como a sua qualidade de vida. No entanto, dados comportamentais relacionados à EM ainda são escassos na literatura, e por isso precisam e devem ser futuramente explorados.

As principais formas clínicas da EM incluem: *surto-remissão* (SR) que atinge cerca de 70 - 80% dos pacientes, nos quais os surtos são de duração variável, seguido por períodos de remissão e com recuperação total ou parcial da atividade locomotora neste período. As manifestações sintomatológicas consistem de disfunção neurológica (exacerbação, relapso ou ataque) com períodos de estabilização ou melhora (remissão). No entanto a maioria dos pacientes com este tipo de EM evolui rapidamente para a forma *progressiva secundária* (PS), na

qual após a remissão dos surtos, os pacientes apresentam uma progressão da doença, com surtos longos e freqüentes seguidos por períodos de remissão curtos. Os surtos apresentam-se tipicamente com o desenvolvimento dos sintomas que excedem de horas a diversos dias, persistindo até por semanas, dissipando-se gradualmente, os quais são causados pelo tráfego de linfócitos T reativos aos antígenos de mielina no SNC causando uma resposta neuroinflamatória aguda com edema associado. A forma *progressivo-primária* (PP) inicia-se com uma progressão ascendente da doença, com ausência de surtos e remissões. A principal característica desta forma é que a doença tem uma progressão de anormalidades neurológicas lenta. Os sintomas mais comuns que se apresentam são: ataxia cerebelar e incontinência urinária. Por fim a *progressiva-remissão* (PR) a qual se caracteriza por progressão contínua da doença, porém com pequenos surtos claramente identificáveis podendo haver alguma recuperação (Frohman *et al.*, 2006; Mcfarland e Martin, 2007). (Figura 3.)



**Figura 3. Ilustração esquemática das diferentes formas clínicas da EM.** Progressiva – remissão, Progressiva – secundária, Progressiva – primária e surto – remissão. Figura adaptada de Lublin e Reingold (Lublin e Reingold, 1996).

A EM é caracterizada por ser uma doença complexa de natureza inflamatória em áreas da substância branca no SNC, assim como desmielinização, astrogliose e variados graus de destruição de axônios e oligodendrócitos (Frohman *et al.*, 2006; Mcfarland e Martin, 2007). A análise detalhada do tecido cerebral dos indivíduos com EM revelou múltiplas placas agudamente demarcadas na substância branca do SNC com uma preferência aos nervos óticos, a substância branca das regiões periventricular do cérebro e da medula espinhal. Dependendo do estágio da lesão e da destruição dos oligodendrócitos, as lesões podem ser caracterizadas como ativa inicial, ativa tardia ou crônica. É importante mencionar que com o passar dos anos, vários grupos têm demonstrado a importância dos componentes do sistema imune em sua patogenia (Sospedra e Martin, 2005). Dentre esses componentes, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> parecem ser de grande importância na gênese da doença. Entretanto, células como macrófagos, linfócitos B e T CD8, associadas à deposição de anticorpos e proteínas do sistema complemento parecem estar mais envolvidos nas lesões propriamente ditas (Rodríguez, 2007).

Neste contexto, dados da literatura sugerem que a EM se inicia com a ativação e lesões mediadas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e citocinas produzidos por estes, porém sendo que as células T citotóxicas amplificam e realmente medeiam essas lesões (Rivera-Quinones *et al.*, 1998; Neumann, 2003). Pacientes com EM ativa apresentam maior frequência na periferia de células T CD8 específicas para proteínas de mielina. Além disso, dentro do SNC, essas células são encontradas tanto nas bordas das lesões como nas regiões perivasculares, enquanto as T CD4 são mais abundantes somente nas bordas das lesões (Crawford *et al.*, 2004). Além disso, células fagocíticas do sistema imune inato como, por exemplo, os macrófagos também medeiam à destruição da bainha de mielina através da liberação de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), além de radicais livres derivados do oxigênio, como o óxido nítrico (NO) (Mcfarland e Martin, 2007).

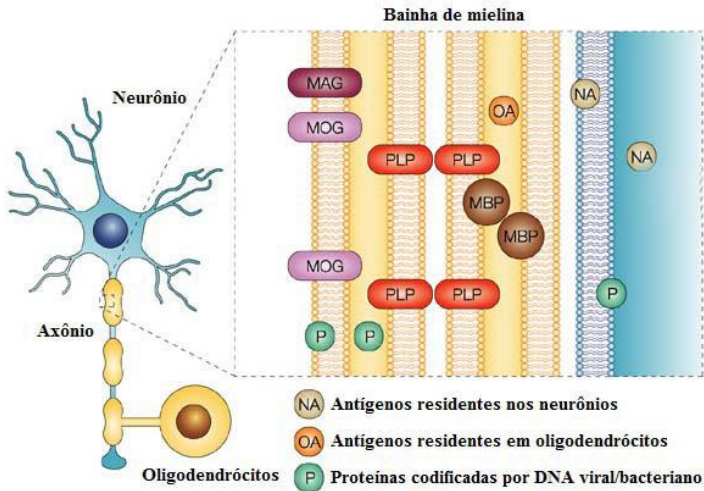
### **1.3 Modelo experimental de EM**

Grande parte do conhecimento adquirido sobre a resposta imunológica na EM deve-se aos estudos desenvolvidos utilizando o modelo de encefalomielite autoimune (ou alérgica) experimental (EAE). O modelo de EAE surgiu no ano de 1933, após o interesse do Prof. Thomas M. Rivers em descobrir o motivo pelos quais pacientes que eram vacinados contra raiva pelo Prof. Louis Pasteur (ano de 1875),

invariavelmente não desenvolviam paralisia. O tratamento anti-rábico consistia em injetar, na pessoa infectada, medula de coelho com raiva, dissecada e triturada em solução salina glicerinada. A vacina permitiu a cura de muitos indivíduos, no entanto, foi identificado que um número significativo de pacientes desenvolvia uma paralisia, muitas vezes fatal, chamada de encefalomielite pós-vacinal. Por esta razão, a EAE passou a ser considerada um modelo experimental para o estudo dos possíveis mecanismos envolvidos nas doenças inflamatórias desmielinizantes de natureza autoimune como, por exemplo, a EM.

A EAE manifesta-se por deficiência neurológica, histologicamente caracterizada por infiltração perivascular de células mononucleares no SNC e imunologicamente pela presença de resposta celular e humoral aos componentes da mielina. A doença pode ser induzida em linhagens susceptíveis de animais pela injeção intraperitoneal (i.p) ou subcutânea (s.c) de peptídeos purificados de diferentes componentes da bainha de mielina. Dentre os antígenos de mielina merecem destaque a proteína básica de mielina (MBP), proteolipoproteína (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG), glicoproteína de mielina dos oligodendrócitos (MOG) e peptídeos encefalitogênicos derivados desses antígenos conforme ilustrado na Figura 4. Importante definirmos aqui que para este tipo de indução dá-se o nome de imunização ativa.

Na indução ativa da EAE, dois tipos de adjuvantes são comumente utilizados: o adjuvante incompleto de Freund (IFA), uma emulsão aquosa contendo o antígeno em óleo mineral e o adjuvante completo de Freund (CFA), contendo micobactérias mortas além dos mesmos componentes do IFA. Os adjuvantes interferem com os mecanismos de tolerância imunológica, retardam a destruição do antígeno, aumentando sua dispersão e proporcionam sua liberação gradativa e constante nos linfonodos periféricos. O componente micobacteriano presente no CFA parece ser de importância fundamental na indução da EAE ativa (Stromnes e Goverman, 2006). Além disso, a transferência de clones de linfócitos (T CD4<sup>+</sup>) sensibilizados a estes componentes também é capaz de induzir a doença em linhagens de roedores e algumas espécies de primatas, e para este tipo de imunização dá-se o nome de imunização passiva (Stromnes e Goverman, 2006). Ambos os procedimentos induzem intensa ativação do sistema imune, produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, expansão de clones encefalitogênicos, rompimento da barreira hemato-encefálica (BHE) e conseqüentemente neuroinflamação.

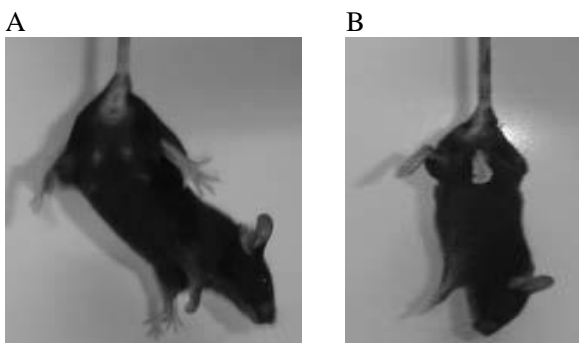


**Figura 4. Diferentes componentes antigênicos da bainha de mielina.** PLP, proteolipoproteína; MAG, glicoproteína associada à mielina; MOG, glicoproteína de mielina dos oligodendrócitos; MBP, proteína básica de mielina. Figura adaptada de Hemmer *et al.* (Hemmer *et al.*, 2002).

Na EAE, a doença pode ser evidenciada através de diferentes sintomas, como paralisia de cauda e de patas traseiras (Figura 5). Entretanto, as formas clínicas da EAE podem variar de acordo com o protocolo de indução utilizado, ressaltando diferenças entre os modelos animais e a EM (Johns e Bernard, 1999; Bradl e Hohlfeld, 2003). A indução por MBP desenvolve a forma *progressivo-primária* da EAE e através de seqüências peptídicas do proteolípídeo PLP, observa-se a forma *progressivo-secundária*. A MBP é um dos principais componentes protéicos da mielina, correspondendo a 30% da mielina total, e está presente no SNP e no SNC. Algumas seqüências peptídicas são consideradas mais encefalitogênicas em alguns grupos de pacientes com EM (Bradl e Hohlfeld, 2003) como, por exemplo, algumas seqüências do MOG. O PLP é uma molécula hidrofóbica expressa exclusivamente no SNC, como uma proteína transmembrana (Simons *et al.*, 2000).

Várias razões contribuem para a utilização da EAE como um modelo de auto-imunidade antígeno-induzido: 1) foi desenvolvida

primeiramente em relação a outros modelos; 2) pode ser facilmente induzida em diversas espécies, as quais incluem camundongos, ratos e coelhos, cobaias e carneiros; 3) as manifestações clínicas, como paralisia e perda do tônus da cauda (em roedores) são facilmente perceptíveis para a maioria dos experimentadores; 4) a MBP, o auto-antígeno primário da EAE, abundante nos tecidos do SNC, pode ser extraída e purificada com facilidade; 5) também poder ser induzida por outros antígenos, como o vírus da encefalomielite murina de Theiler ou o coronavírus JHM em camundongos BALB/c (Grigoriadis e Hadjigeorgiou, 2006).



**Figura 5. Fotografia ilustrativa dos animais durante o desenvolvimento da EAE.** (A) Animais do grupo controle tratados apenas com salina. Cauda com tônus e patas posteriores normais; (B) Animais do grupo controle tratado com 200  $\mu$ g de MOG<sub>35-55</sub>, 2 imunizações nos flancos traseiros, dia 18 após imunização (18 dpi). Cauda com perda total do tônus e patas posteriores paralisadas.

Nos últimos anos, os camundongos têm sido extremamente úteis para o estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da EAE. O modelo experimental utilizando camundongos é caracterizado tanto pela inflamação por células mononucleares quanto por desmielinização, características que se assemelham às da EM humana. Outra vantagem do uso de camundongos é a ampla variedade de linhagens disponíveis. Além disso, outra vantagem considerável é que algumas linhagens susceptíveis como a SJL/J e a PL/J não são resistentes à re-indução da doença. De forma importante é possível induzir surtos crônicos da EAE nestes animais obtendo um modelo que mais se assemelha à EM humana.



Outro modelo murino, o C57BL/6, tem sido amplamente utilizado para a indução de EAE crônica severa e sem surtos, especialmente quando se utiliza a proteína MOG (60 KDa) como indutora da doença. Apesar de muito menos abundante que a PLP, respondendo por 0,01%-0,05% das proteínas da mielina, a proteína MOG tem sido objeto de estudos que apóiam a possibilidade dela ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM (Sospedra e Martin, 2005). Esta proteína pertence à superfamília das imunoglobulinas e apresenta alta homologia entre roedores e humanos (cerca de 90%) sendo formada por uma seqüência de 218 aminoácidos (Johns e Bernard, 1999). Estudos demonstram que a seqüência 35-55 de aminoácidos seja o epítipo primário durante a resposta imune na EAE (Leadbetter *et al.*, 1998). Entretanto, sua função no SNC permanece indefinida, embora alguns trabalhos tenham sugerido que essa proteína atue não somente como molécula de adesão e receptor celular, mas também como estabilizador dos micro-túbulos dos oligodendrócitos (Johns e Bernard, 1999). Dados preliminares demonstraram que pacientes com EM apresentam resposta de anticorpos anti-MOG mais expressiva quando comparado aos níveis de anti-PLP e anti-MBP (Haase *et al.*, 2001). A tabela abaixo ilustra as seqüências encefalitogênicas das proteínas de mielina, assim como a susceptibilidade de algumas linhagens de roedores.

**Tabela 1. Seqüência de peptídeos indutores da EAE de acordo com a espécie, assim como as respectivas linhagens suscetíveis.**

<b>Espécie</b>	<b>MHC classe II</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Antígeno</b>
Camundongo	H-2 <sup>u</sup>	PL/J	MOG <sub>35-55</sub>
	H-2 <sup>b</sup>	C57BL/6	MOG <sub>35-55</sub>
	H-2 <sup>b</sup>	C3H.SW	MOG <sub>35-55</sub>
	H-2 <sup>g7</sup>	NOD/Lt	MOG <sub>35-55</sub>
	H-2 <sup>b</sup>	SJL/J	MOG <sub>92-106</sub>
	H-2 <sup>b</sup>	SJL/J e SWR/L	MBP <sub>87-89</sub>
	H-2 <sup>b</sup>	SJL/J e SWR/L	PLP <sub>139-151</sub>
Rato	-	SWX/J	PLP <sub>178-191</sub>
	RT-1 <sup>1</sup>	Lewis	MOG <sub>1-218</sub>
	RT-1 <sup>1</sup>	Lewis	MOG <sub>92-106</sub>
	RT-1 <sup>1</sup>	Lewis	MOG <sub>35-55</sub>
	RT-1 <sup>1</sup>	Lewis	MOG <sub>1-20</sub>
	RT-1 <sup>1</sup>	Brown-Norway	MOG <sub>1-125</sub>

Dados obtidos de Von Budingen *et al.* (Von Budingen *et al.*, 2001).

A EAE induzida por MOG pode ser definida como uma doença crônica caracterizada por inflamação mediada por linfócitos T, B e por células fagocíticas, como os macrófagos. Os sinais clínicos podem aparecer em torno do dia 12 após a imunização, os quais podem progredir até o dia 20. Tem sido sugerido que células ativadas por MOG entram no SNC e ativam a microglia a secretar TNF- $\alpha$ , levando a indução de moléculas de adesão como, por exemplo, VCAM e ICAM. Essas moléculas de adesão facilitam o tráfego de células mononucleares através do endotélio (Stromnes e Goverman, 2006).

#### **1.4 Patogênese da EM, assim como do seu modelo experimental EAE**

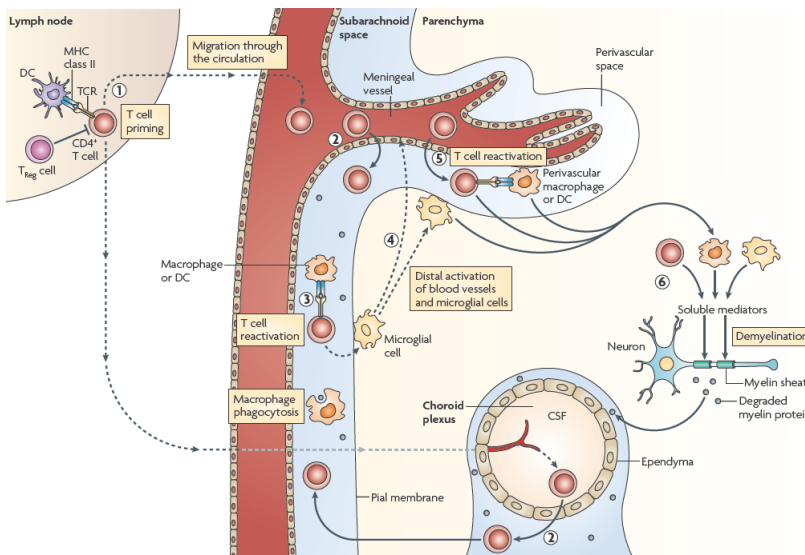
Até recentemente acreditava-se que a EM, e o seu modelo experimental, era mediada por linfócitos CD4<sup>+</sup> Th1, os quais necessitam da interleucina-12 (IL-12) para sua diferenciação, e são caracterizados pela secreção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e TNF- $\alpha$ , através do fator de transcrição T-bet. Esta conclusão foi baseada em estudos prévios, os quais demonstraram que a administração de IFN- $\gamma$  em pacientes com EM exacerba os sinais clínicos da doença. Além disso, o aumento da severidade clínica da doença está associado com aumento na produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 no SNC dos pacientes com EM. Neste contexto, o IFN- $\gamma$  induz a expressão de MHC do tipo II no SNC, e conseqüentemente atraem macrófagos e monócitos, os quais se tornam ativados pela liberação dos mediadores pró-inflamatórios e que por fim, culmina com o surgimento da neuroinflamação e desmielinização dos axônios dos neurônios, assim como das manifestações clínicas da EAE e da EM.

No entanto, diversas observações experimentais têm levado os pesquisadores a questionar este paradigma. Por exemplo, dados mais recentes demonstram que camundongos com deleção gênica (nocautes) para a IL-12, IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  desenvolvem a EAE clássica, enquanto que camundongos nocautes para a interleucina-23 (IL-23) são completamente resistentes ao surgimento da EAE. A IL-23 é uma citocina essencial para o desenvolvimento e maturação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> Th17. As células Th17 diferenciam-se na presença do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), IL-6 e IL-21, e produz elevados níveis de IL-17A e IL-7F, através do fator de transcrição do receptor órfão relacionado ao ácido retinóico gama (ROR- $\gamma$ T). Além disso, as células Th17 ainda têm a capacidade de induzir diretamente a

ativação de outros tipos celulares a produzirem mediadores pró-inflamatórios como, por exemplo, metaloproteinases de matriz, fator estimulador de colônia macrófagos/granulócitos (GM-CSF), entre outros. Dados recentes demonstram que a transferência de linfócitos Th17 induz EAE mais severa quando comparada com a transferência de células Th1. Por esta razão, atualmente acredita-se que os linfócitos Th17 sejam as principais células envolvidas com o surgimento e manutenção das doenças auto-imunes no SNC como, por exemplo, a EM (Frohman *et al.*, 2006; Mcfarland e Martin, 2007; Goverman, 2009).

Vários fatores podem explicar os fenômenos de iniciação e de transmigração celular durante a EAE. De acordo com Goverman (Goverman, 2009), o processo de desmielinização inicia-se com a ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup> Th1 e Th17 pelas células dendríticas, as quais apresentam antígenos de mielina a estas células nos órgãos linfóides periféricos como, por exemplo, linfonodos e baço. Após a ativação periférica, estas células T auto-reativas entram no SNC cruzando a BHE pelo plexo coróide, auxiliada não somente pelo aumento da expressão de citocinas inflamatórias como também por moléculas de adesão, integrinas e receptores de quimiocinas expressos nas células endoteliais da BHE. Neste contexto, talvez as moléculas de adesão como as selectinas (E-, P-, e L-Selectinas) e as interações de integrinas VLA-4 (*very late antigen-4*) e LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) sejam as mais importantes. Além disso, um dos mecanismos propostos para esta transmigração é que a ativação das células endoteliais da BHE através dos receptores de reconhecimento padrão como, os receptores do tipo Toll-4 (TLR4, *Toll-like Receptor-4*), induz alta expressão de P-selectinas, facilitando a transmigração das células T para dentro do SNC (Racke *et al.*, 2005). E por fim, o engajamento de agonistas de TLRs em astrócitos é também capaz de aumentar a produção de IL-6 e outras quimiocinas, aumentando o recrutamento de células com potencial inflamatório para o SNC (Farina *et al.*, 2005). Dentro do SNC, os antígenos de mielina, sobretudo a proteína básica da mielina (PBM) e a proteína mielodendrítica (MOG), são re-apresentados por astrócitos, macrófagos e células gliais aos linfócitos T, os quais em conjunto liberam mediadores inflamatórios solúveis que desencadeiam a desmielinização (Figura 6). Além disso, estes mediadores produzidos no SNC induzem aumento da permeabilidade vascular e uma maior infiltração celular, porém basicamente composta por células fagocíticas, como os

macrófagos/monócitos responsáveis por amplificar a resposta neuroinflamatória (Goverman, 2009).



**Figura 6. Patogênese da EAE.** (1) Ativação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> Th1 e Th17 pelas células dendríticas nos órgãos linfóides periféricos, contra epítopos de mielina; (2) Migração das células auto-reativas aos antígenos de mielina para o SNC e entrada pelo plexo coróide; (3-5) Re-ativação dos linfócitos T contra os antígenos de mielina apresentados pelas células gliais e dendríticas; (6) Neuroinflamação com produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios contra a bainha de mielina com conseqüente desmielinização e liberação de antígenos de mielina. Figura adaptada de Goverman, J (Goverman, 2009).

A produção de quimiocinas como a CXCL12 ou a CCL2, por células gliais como os astrócitos ou microglia, também possui papel importante na ativação e atração de células T encefalitogênicas para o SNC (Schreiber *et al.*, 2007). O bloqueio de CCL19 e CCL21 ou de seu receptor CCR7 é capaz de diminuir o número de células T migrantes associadas às células endoteliais da BHE e conseqüentemente a inflamação no SNC (Engelhardt, 2006). Dados mais recentes demonstram que além destas quimiocinas, o eixo CCR6 – CCL20 regula a entrada de células Th17 reativas à MOG no SNC através do plexo

coróide (Reboldi *et al.*, 2009). Estes resultados em conjunto indicam que a modulação destas quimiocinas representa importante alvo terapêutico para o surgimento de novos medicamentos para o tratamento da EM.

Na EAE, assim como na EM, o surgimento de desmielinização e morte neuronal são mediados por uma série de fatores, sejam estes do sistema imune inato ou adaptativo como, por exemplo, células T CD4<sup>+</sup> e citotóxicas T CD8<sup>+</sup>. Além disso, a produção excessiva de NO (óxido nítrico) por macrófagos ativados, assim como a presença de metaloproteinases (*MMP*, *matrix metalloproteinase*) são fatores fundamentais para a patogênese da EAE. Drogas como o antibiótico minociclina, a qual já é utilizada na prática médica, parece reduzir os níveis de MMP-9 diminuindo em consequência a severidade da EAE (Brundula *et al.*, 2002).

## 1.5 Tratamentos da EM e os novos alvos terapêuticos

Atualmente não existe cura para a EM e dentre os medicamentos mais comuns utilizados para o tratamento da EM estão os interferons (IFNs). Existem dois tipos de IFNs: IFN-β1a (Rebif<sup>®</sup>, EMD Serono and Avonex<sup>®</sup>, Biogen) e IFN-β1b (Betaseron<sup>®</sup>, Bayer), os quais são administrados através de injeções subcutâneas ou intramusculares diárias. No entanto, a principal limitação existente na terapia com IFN-β é que aproximadamente 30 – 50% dos pacientes não respondem a esta terapia. Por esta razão, nestes casos é recomendado o uso do acetato de glatiramer (GA), comercialmente conhecido como Copaxone<sup>®</sup> (TEVA Neuroscience). Esse medicamento é uma mistura de polipeptídeos sintéticos composto de quatro aminoácidos (L- ácido glutâmico, L-lisina, L-alanina e L-tirosina), que se assemelham à MBP e tem demonstrado ser eficaz na prevenção e supressão da EAE (Schrempf e Ziemssen, 2007).

O tratamento com GA causa mudanças na frequência e no padrão de secreção de citocinas/quimiocinas e na função efetora das células GA-T específicas *in vivo*, desta forma, induzindo células T regulatórias GA CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> específicas e estimulando a troca do perfil Th1/Th17 para Th2 com consequente, aumento na secreção de citocinas antiinflamatórias. Os linfócitos Th2, assim como as células Treg GA-reativas são capazes de migrar através da BHE e expressam citocinas antiinflamatórias como, por exemplo, IL-4, IL-10, TGF-β e IL-5, as quais inibem a atividade das células Th1 e Th17 auto-agressivas. Além disso, células T-GA reativas secretam fatores neurotróficos como,

por exemplo, BDNF que poderão desencadear a re-mielinização axonal (Schrempf e Ziemssen, 2007). No entanto, o custo do Copaxone® é extremamente elevado, o que dificulta muito o acesso ao medicamento. Além disso, o tratamento medicamentoso geralmente está associado a outros tratamentos suporte como a fisioterapia, a psicologia, a fonoaudiologia, a terapia ocupacional, a fim de manter a qualidade de vida do paciente principalmente nos pacientes com seqüelas incapacitantes (Callegaro *et al.*, 2002).

No entanto, atualmente novas terapias estão sendo estudadas em pacientes com EM, as quais merecem destaque os anticorpos monoclonais e as terapias orais. Anticorpos monoclonais (*mAbs*, na sigla em inglês) foram descritos pela primeira vez em 1975 pelos cientistas César Milstein e Georges Köhler (Köhler e Milstein, 1975). Estas moléculas são anticorpos produzidos por um único clone de um linfócito B parental, sendo, portanto, idênticos em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas. Estes anticorpos podem ser gerados em laboratório a fim de reconhecer e se ligar a qualquer antígeno de interesse. Dentre os anticorpos monoclonais testados e utilizados para o tratamento da EM destacam-se: **natalizumab**, aprovado para o tratamento da EM do tipo surto-remissão em 2004, o qual é um anticorpo monoclonal contra a molécula de adesão  $\alpha 4$ -integrina (Bosch *et al.*, 2011) e que reduz a migração de leucócitos para o SNC de pacientes com EM, evitando assim o desenvolvimento de incapacidade neurológica permanente (Gunnarsson *et al.*, 2011); **rituximab**, anticorpo monoclonal quimérico contra a proteína de superfície celular CD20, encontrada primariamente em linfócitos B. Clinicamente utilizado para o tratamento de linfomas, leucemias e rejeições a transplantes, assim como para a EM (Barten *et al.*, 2011); **alemtuzumab**, anticorpo monoclonal humanizado contra a proteína de superfície celular CD52, a qual é altamente expressa em monócitos e linfócitos, e **daclizumab**, anticorpo monoclonal contra a proteína CD25, a qual estimula a produção e ativação das células CD56<sup>bright</sup> natural killer (NK), e que nos pacientes com EM regulam negativamente os linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Barten *et al.*, 2011).

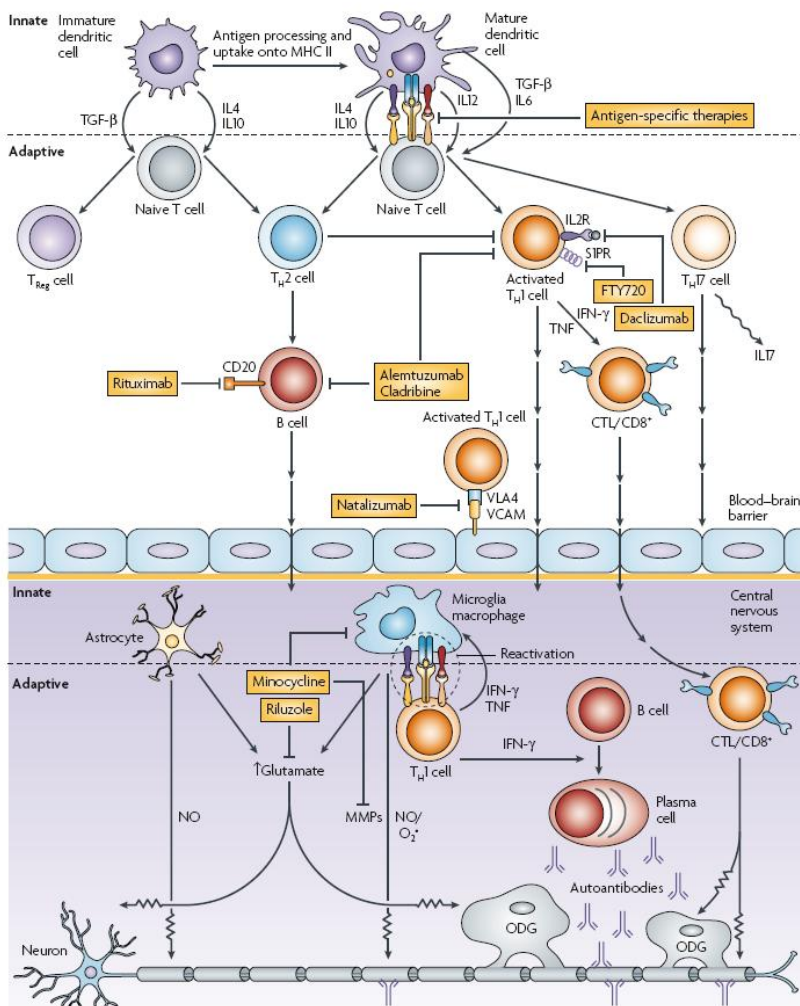
Em meio aos novos medicamentos orais aprovados para o tratamento da EM, merecem destaque: **fingolimod (FTY720)**, aprovado recentemente pelo FDA (Setembro de 2010) para o tratamento da EM do tipo surto-remissão. FTY720 é um modulador do receptor de esfingosina-1 fosfato (S1P1), o qual é expresso, principalmente, em linfócitos e regula a migração destas células. A ligação do fingolimod

aos receptores SIPI promove internalização irreversível destes receptores evitando assim a saídas dos linfócitos T auto-reativos dos órgãos linfóides secundários (Lopez-Diego e Weiner, 2008). Dados experimentais demonstraram que a administração do FTY720 inibe o desenvolvimento da EAE em roedores (Barten *et al.*, 2011); **cladribine**, análogo nucleosídeo da adenosina, o qual inibe a síntese de DNA pela geração do 2-clorodeoxiadenosina trifosfato. O cladribine e seu metabólito inibem a ativação e diferenciação das células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e linfócitos B, assim como regulam a produção de citocinas/auto-anticorpos por estas células; **laquinimod**, nova droga que induz uma mudança no balanço entre as células Th1 e Th2, o que lhe confere a característica imunomoduladora, mas não imunossupressora; **dimetil fumarato**, inibidor do stress oxidativo e protetor dos axônios dos neurônios contra mediadores inflamatórios, e **dalfampridine**, bloqueador seletivo dos canais de potássio dependente de voltagem, o qual restaura a condução dos impulsos elétricos em axônios desmielinizados (Barten *et al.*, 2011) (Figura 7).

Além disso, estudos recentes têm relatado que o uso de canabinóides é uma relevante alternativa para o tratamento dos pacientes com EM (Bisogno e Di Marzo, 2010; Rossi *et al.*, 2011; Zajicek e Apostu, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Por exemplo, a administração de  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) em pacientes com EM induz melhora do humor, associada com a modulação da sensação dolorosa (Svendsen *et al.*, 2004). Dados experimentais demonstraram que a administração de canabidiol (Kozela *et al.*, 2011), um derivado canabinóide, assim como 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Lourbopoulos *et al.*, 2011), um ligante endógeno do sistema canabinóide, inibem a neuroinflamação induzida pela EAE em camundongos. Em junho de 2010, a Agência Regulatória de Medicamentos do Reino Unido licenciou a utilização do Sativex (Nabiximols), um medicamento em forma de spray contendo 2,7 mg de THC e 2,5 mg de canabidiol, para o tratamento de pacientes com EM.

No entanto todas estas terapias supracitadas em sua grande totalidade estão associadas com graves efeitos adversos, sem alterar de forma seletiva e/ou efetiva o curso da doença. Por esta razão, o estudo sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da EM, para posterior identificação de novos alvos terapêuticos faz-se necessário. Neste sentido, o sistema caliceína-cinina, assim como a modulação farmacológica dos seus receptores podem constituir um alvo terapêutico

relevante para o controle da gênese, desenvolvimento e manutenção da EAE (conforme explanado abaixo).



**Figura 7. Immunopatogênese da EM, e os possíveis alvos terapêuticos.** Destaque para as novas terapias utilizadas no tratamento da EM: FTY720, daclizumab, alemtuzumab, rituximab, natalizumab e minociclina. CTL, linfócito T citotóxico; MMPs, metaloproteinases; OGD, oligodendrócitos; NO, óxido nítrico; S1PR, receptor de esfingosina-1 fosfato. Figura adaptada de Lopez-Diego e Weiner (Lopez-Diego e Weiner, 2008).



## 1.6 Sistema calicreína-cinina e seus receptores

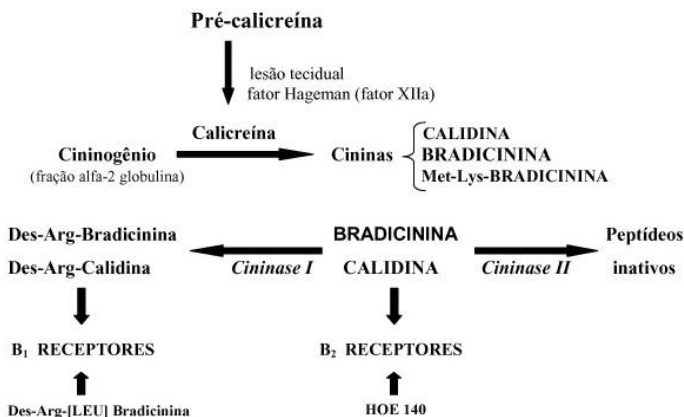
A história da bradicinina iniciou-se em 1948 quando três pesquisadores brasileiros Professor Maurício Rocha e Silva, Wilson Teixeira Beraldo e Gastão Rosenfeld decidiram investigar as propriedades farmacológicas do veneno da jararaca. Inicialmente, os pesquisadores misturaram o veneno da serpente com sangue de cachorro, e em seguida testaram esta preparação em órgão isolado de cobaia. Como a substância em estudo deveria ser a histamina, os pesquisadores pretendiam visualizar uma contração da musculatura lisa, conforme indicavam as pesquisas em cobras australianas por pesquisadores australianos e ingleses. Porém, os resultados obtidos foram que a contração observada se dava de forma lenta, porém consistente, e se mantinha por alguns minutos, diferentemente da histamina. Além disso, antagonistas  $H_1$  da histamina e a atropina falharam em inibir a contração do órgão isolado após a adição do plasma de cão que recebeu o veneno da jararaca. Estes resultados levaram os autores a definir uma nova substância, que neste contexto foi denominada de bradicinina (*bradys* = lento, *kinesis* = movimento). A primeira comunicação sobre a descoberta, assinada por Rocha e Silva, Gastão Rosenfeld e Wilson Beraldo, saiu em 1949, no volume inaugural da revista *Ciência e Cultura*, e posteriormente em 1950 o trabalho completo foi publicado no *American Journal of Physiology*, com o título "*Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin*". Em seguida, dados experimentais demonstraram que quatro metalopeptidases são responsáveis pelo metabolismo da BK como, por exemplo, a enzima conversora de angiotensina (ECA), também chamada de cininases II, aminopeptidases P (APP), endopeptidase neutra (NEP) e carboxipeptidases M e N (CPM, CPN), também conhecida como cininases I (Moreau *et al.*, 2005).

Uma importante contribuição derivada da descoberta de Beraldo e Rocha e Silva se devem ao pesquisador Sérgio Henrique Ferreira, que, juntamente com seus colaboradores, isolou, na década de 60, do veneno da jararaca, um princípio ativo capaz de intensificar a resposta à bradicinina e que foi denominado FPB (fator potenciador da bradicinina). O FPB é descrito como uma família de pequenos peptídeos presentes no veneno, os quais especificamente potenciam a atividade hipotensora da bradicinina (Ferreira, 1965; Ferreira e Rocha E Silva, 1965; Amorim *et al.*, 1967). A partir do veneno da jararaca, Sérgio

Ferreira chegou a uma substância capaz de inibir os agentes naturais do organismo que elevam a pressão arterial, chamados angiotensina I e II, ao mesmo tempo em que prolongam o efeito hipotensor da bradicinina. Além disso, neste mesmo contexto o cientista inglês John Vane, e sua equipe, mostraram que a enzima conversora de angiotensina chamada ACE, é responsável pela formação de angiotensina II (que causa hipertensão arterial). Desde essa época, essa enzima passou a ser o alvo da indústria farmacêutica para a obtenção de drogas anti-hipertensivas. Por esta razão, John Vane e sua equipe utilizaram substâncias extraídas do veneno da jararaca para descobrir os primeiros anti-hipertensivos naturais. Atualmente sabe-se que o captopril atua inibindo a enzima cininases II ou enzima conversora da angiotensina, a qual catalisa tanto a síntese de angiotensina II, a mais potente substância pressora conhecida, quanto à destruição da bradicinina, o mais potente vasodilatador (Bakhle, 1968; Bakhle *et al.*, 1969).

O sistema caliceína-cinina consiste do precursor cininogênio, das enzimas proteolíticas caliceínas, dos peptídeos de cininas e de dois receptores acoplados a proteína-G, receptor B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Os peptídeos cininérgicos incluem a bradicinina (BK, Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), calidina, T-cininas (este último apenas em ratos), assim como os seus metabólitos ativos, a des-Arg-bradicinina, Lys-BK e Met-Lys-BK, os quais circulam em baixas concentrações no plasma e são rapidamente degradados em cerca de 20 segundos por um grupo de peptidases conhecidas por cininases (Regoli e Barabe, 1980; Steranka *et al.*, 1988; Drapeau *et al.*, 1991; Wirth, Breipohl *et al.*, 1991; Wirth, Hock *et al.*, 1991; Adam *et al.*, 2000).

Os cininogênios são glicoproteínas precursoras dos peptídeos de cininas e são divididos em: cininogênios de alto e baixo peso molecular, os quais contêm a seqüência de cininas em sua porção média. Em humanos e em muitos mamíferos, o termo “cininas” refere-se ao nonapeptídeo BK, e ao decapeptídeo calidina (Lys-BK), e seus metabólitos des-Arg carboxi-terminais. Nos humanos, a caliceína plasmática forma a BK, a partir de cininogênio de alto peso molecular, enquanto que a caliceína tecidual forma calidina a partir do cininogênio de alto e baixo peso molecular. Além disso, a caliceína plasmática forma BK, enquanto que a tecidual forma BK e DALBK (Regoli e Barabe, 1980; Calixto *et al.*, 2000; Calixto *et al.*, 2001; Campbell, 2003) (Figura 8).

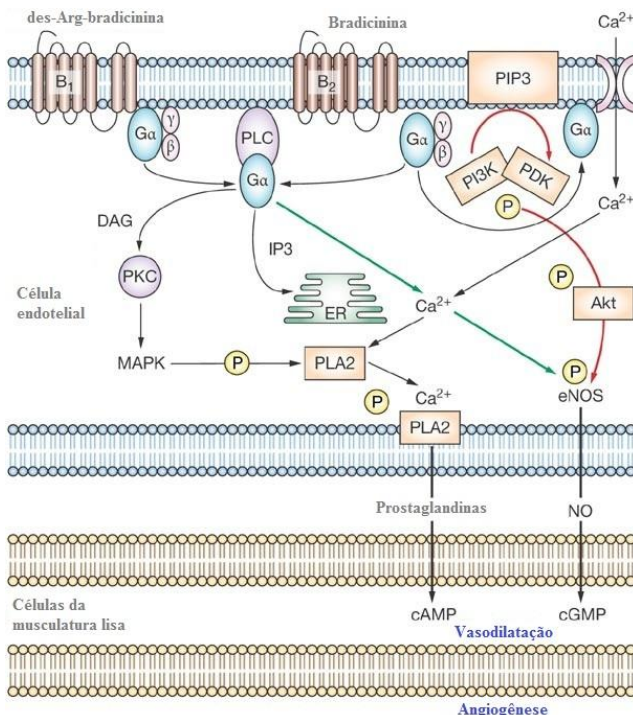


**Figura 8.** Esquema ilustrativo do sistema caliceína-cinina, englobando a síntese das cininas a partir da fração  $\alpha_2$ -globulina (cinogênios), a degradação pelas cininases I e II, e os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. BK e calidina agonistas dos receptores B<sub>2</sub>; des-Arg-BK e des-Arg-calidina agonistas dos receptores B<sub>1</sub>. HOE 140 e des-Arg-Leu-BK antagonista dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub>, respectivamente. Imagem adaptada de <http://www.mashpedia.com.br>

As cininas são responsáveis por diversos efeitos fisiológicos, como, por exemplo, controle da pressão arterial, contração e relaxamento da musculatura lisa, permeabilidade vascular e controlam os mecanismos de transmissão da dor (Regoli e Barabe, 1980; Proud e Kaplan, 1988; Ahluwalia e Perretti, 1999; Calixto *et al.*, 2000; Calixto *et al.*, 2001; Couture *et al.*, 2001). Suas ações são mediadas pela estimulação de dois subtipos de receptores transmembrana acoplados à proteína-G, denominados receptores tipo 1 (B<sub>1</sub>) e tipo 2 (B<sub>2</sub>). Os receptores B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) se ligam preferencialmente à BK e são constitutivamente expressos em diversos tecidos e considerados como os principais mediadores dos efeitos fisiológicos da BK. Diferentemente dos B<sub>2</sub>R, os receptores B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R), se ligam ao metabólito da BK (des-Arg<sup>9</sup>-BK) e são normalmente ausentes em condições fisiológicas, sendo expressos durante lesão tecidual, infecções teciduais e estímulos inflamatórios como, por exemplo, tratamento com endotoxina bacteriana e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) (Marceau e Bachvarov, 1998; Ni *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2001; Couture *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2004; Marceau e Regoli, 2004). Porém, em alguns tecidos especialmente no SNC, os B<sub>1</sub>R são expressos de maneira

constitutiva e sob dano tecidual e/ou resposta inflamatória sua expressão torna-se aumentada (Calixto *et al.*, 2004). As ligações das cininas aos seus respectivos receptores ativam sistemas de segundos mensageiros, em particular óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGs), através da ativação da proteína G. Ativação da adenilato ciclase ou guanilato ciclase são mecanismos de transdução que conduzem à produção de AMPc e GMPc, eficientes mecanismos vasodilatadores em células de músculo liso vascular (Moreau *et al.*, 2005).

As cininas apresentam papel importante durante processos inflamatórios e/ou dano tecidual, uma vez que regulam a liberação de diversos mediadores inflamatórios e a estimulação de neurônios nociceptores (Marceau e Bachvarov, 1998; Ni *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2000; Calixto *et al.*, 2001; Couture *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2004; Marceau e Regoli, 2004). A ativação dos B<sub>2</sub>R, constitutivamente expressos em neurônios promove hiperalgesia através da produção de diacilglicerol (DAG) e proteína quinase C (PKC). A BK apresenta a capacidade de estimular a liberação de PGs, citocinas e radicais livres pelos neurônios sensitivos, células imunes e endoteliais ou fibroblastos (Dray, 1997). Além disso, a BK aumenta a liberação de substância P e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina em culturas de neurônios de ratos (Vasko *et al.*, 1994). Andreeva e Rang (1993) demonstraram que o aumento de BK no SNC é controlado por prostaglandinas e reduzido por inibidores da enzima ciclooxigenase (COX) (Andreeva e Rang, 1993). O bloqueio farmacológico dos receptores B<sub>2</sub>, com antagonistas seletivos, promove analgesia em modelos de hiperalgesia inflamatória aguda (Calixto *et al.*, 2000). O papel vasorrelaxante da BK mediada pelo receptor B<sub>2</sub> para manutenção do tônus vascular foi demonstrado em camundongos nocautes para o receptor B<sub>2</sub>, que apresentaram um leve, mas significativo aumento da pressão sanguínea sistêmica basal (Duka *et al.*, 2001). A ativação do receptor B<sub>2</sub> pela BK promove através da estimulação de fosfolipases A<sub>2</sub> e C, aumento da concentração do cálcio citosólico e a formação de potentes vasodilatadores como a PGI<sub>2</sub> e o NO. O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina através da ação de uma enzima constitutiva dependente da via cálcio-calmodulina, NO sintase. O NO liberado por células endoteliais é difundido para células de músculo liso vascular subjacente, onde aumenta a formação de GMPc através da ativação da guanilato ciclase solúvel. Aumento do GMPc está diretamente correlacionado com a inibição da contração das células de músculo liso (Linz *et al.*, 1995) (Figura 9).



**Figura 9. Imagem ilustrativa das vias de sinalização intracelular após a ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nas células endoteliais.** PLC, fosfolipase C; PI3K, fosfatidilinositol 3 quinase; PLA<sub>2</sub>, fosfolipase A<sub>2</sub>; NO, óxido nítrico; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; Akt, quinase serina-treonina Akt; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; ER, retículo endoplasmático; PKC, proteína quinase C; DAG, diacilglicerol; IP3, inositol 3 fosfato. Figura adaptada de Madeddu *et al.* (Madeddu *et al.*, 2007).

Estudos relacionados com os receptores B<sub>1</sub> demonstraram que sua expressão apresenta importante função, principalmente na manutenção da inflamação (Calixto *et al.*, 2004; Marceau e Regoli, 2004), e os efeitos pró-inflamatórios dos B<sub>1</sub>R incluem dor, edema e aumento do trânsito de leucócitos para as regiões inflamadas (Couture *et al.*, 2001). Ni *et al.* (1998b) revelaram a existência de um local de ligação do fator transcricional NF-κB na região promotora do B<sub>1</sub>R de humanos, o qual parece ser essencial para o controle da transcrição deste

receptor após exposição a agentes inflamatórios como, por exemplo, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e lipopolissacarídeo (LPS) (Ni *et al.*, 1998). De modo relevante, Medeiros *et al.* (2004) demonstraram que o dano tecidual na veia porta de ratos é capaz de induzir a expressão do B<sub>1</sub>R, processo que envolve a degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  e subsequente translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, o qual se liga em regiões gene - específicas do DNA favorecendo a transcrição de diversos mediadores inflamatórios (Medeiros *et al.*, 2004). Passos *et al.* (2004) demonstraram que a expressão dos B<sub>1</sub>R após a administração de LPS na pata de ratos, é um processo que envolve a ativação do NF- $\kappa$ B, migração de neutrófilos e liberação de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e do fator ativador de plaquetas-PAF) (Passos *et al.*, 2004). Dados recentes demonstram que p38 MAPK e quinase de junção NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) estão envolvidas na expressão do RNAm para o B<sub>1</sub>R induzido por trauma vascular (Medeiros *et al.*, 2004).

O SNC apresenta todos os componentes do sistema caliceína-cinina, os quais se encontram distribuídos, principalmente no córtex, cerebelo, porém em maior concentração no hipotálamo, pituitária e glândula pineal, e a ativação deste sistema no cérebro estimula a produção de ácido araquidônico e seus metabólitos, contribuindo para a formação de edema e vasodilatação cerebral (Walker *et al.*, 1995). A produção e a liberação de mediadores inflamatórios como, por exemplo, radicais livres (OH $\cdot$  e NO) e citocinas inflamatórias como, por exemplo, TNF- $\alpha$  podem contribuir de maneira importante para o efeito citotóxico direto no tecido cerebral. Em humanos, agonistas para os receptores de cininas aumentam a permeabilidade da BHE, através da estimulação da produção de NO e por ativação da COX em células endoteliais cerebrais (Prat *et al.*, 2000; Sarker *et al.*, 2000).

As reações inflamatórias cerebrais podem ser causadas por diferentes formas de lesões, incluindo isquemia cerebral, encefalomielite e meningite. Uma importante consequência da inflamação cerebral é o edema, com aumento da permeabilidade vascular, fluxo sanguíneo e da retenção de fluidos no tecido inflamado. A ativação dos receptores de cininas no cérebro estimula também a produção de ácido araquidônico e seus metabólitos, contribuindo assim para a formação de edema e vasodilatação cerebral (Walker *et al.*, 1995). Alguns trabalhos demonstraram o efeito protetor dos antagonistas dos receptores B<sub>2</sub> no surgimento do dano cerebral (Gorlach *et al.*, 2001; Ding-Zhou *et al.*, 2003; Ivashkova *et al.*, 2006). No SNC, os componentes do sistema caliceína-cinina encontram-se distribuídos,

principalmente no córtex, cerebelo, porém em maior concentração no hipotálamo, pituitária e glândula pineal (Walker *et al.*, 1995).

Recentemente foi demonstrada a participação das reações inflamatórias e dos receptores de cininas em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas (Medeiros *et al.*, 2007; Prediger *et al.*, 2008; Danielisova *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2009), no entanto até o ano de 2008 existiam apenas alguns indicativos da participação do sistema calicreína-cinina na EM.

Primeiramente, níveis aumentados de BK, des-Arg<sup>9</sup>-BK, calicreínas-1, calicreínas-6, assim como cininogênios de alto e baixo peso molecular foram encontrados em tecidos cerebrais de animais com EAE e pacientes com EM (Germain *et al.*, 1988). Prat *et al.* (2000) demonstraram que a administração de IFN- $\gamma$  em culturas de células endoteliais de cérebro humano aumenta a expressão dos receptores B<sub>1</sub>, e que o agonista deste receptor, R-838, aumenta a permeabilidade destas células através da BHE (Prat *et al.*, 2000). Neste mesmo estudo, os autores ainda demonstraram que o efeito biológico do agonista R-838 foi prevenido pelo antagonista do receptor B<sub>1</sub>, R-715, assim como pelo bloqueador da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME. Além disso, Prat e colaboradores (2005) foram os primeiros a demonstrar o aumento da expressão do RNAm do B<sub>1</sub>R em células mononucleares derivadas do sangue periférico, provenientes de pacientes com EM, e esta expressão foi correlacionada com o surgimento de surtos nestes pacientes. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que os linfócitos obtidos de pacientes com *lúpus eritematoso* (doença inflamatória periférica) e epilepsia (patologia cerebral não-inflamatória) não expressaram o RNAm para o B<sub>1</sub>R, enquanto que pacientes com polineurite inflamatória apresentaram a expressão mínima destes receptores (Prat *et al.*, 2005).

Como descrito anteriormente, a EM não possui um tratamento eficaz, sendo que a terapia existente baseia-se na administração de fármacos imunossupressores e interferons, durante os períodos de exacerbação da doença. No entanto, estes medicamentos causam consideráveis efeitos adversos, sem alterar de forma efetiva o curso dessa patologia. Desta forma, a procura de terapias específicas, que tenham ação sobre a resposta inflamatória característica desta doença, pode apresentar resultados promissores para o melhor entendimento da EM.

Em conjunto, os achados da literatura indicam que as cininas podem contribuir como um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas destinadas ao controle e tratamento da EM. Desta forma, a

participação do sistema cininérgicos ainda necessita ser melhor investigado em diversos aspectos, especialmente no controle do desenvolvimento e manutenção da resposta imune-inflamatória da EM, assim como da EAE. Neste sentido, estudos inerentes à participação das cininas e seus receptores  $B_1$  e  $B_2$  presentes no SNC, carecem ser melhor elucidados. Por esta razão a hipótese deste trabalho foi verificar a correlação entre os receptores  $B_1$  e  $B_2$  de bradicinina com a modulação da EAE. A fim de testar esta hipótese os seguintes objetivos foram desenhados.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho pretende investigar com o uso de técnicas farmacológicas, bioquímicas e de biologia molecular, a participação dos receptores  $B_1$  e  $B_2$  das cininas na gênese, desenvolvimento e manutenção da EAE em camundongos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Para atingir o objetivo geral proposto, o estudo foi desenvolvido em etapas, de modo a alcançar os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar o papel dos receptores cininérgicos  $B_1$  e  $B_2$  na gênese da EAE, analisando o efeito da administração repetida de agonista e de antagonistas seletivos para ambos os receptores durante a fase de indução da EAE;
2. Avaliar a susceptibilidade de animais com deleção gênica para os receptores  $B_1$  e  $B_2$  durante o desenvolvimento da EAE;
3. Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores  $B_1$  e  $B_2$  durante a fase crônica da EAE, após o surgimento dos sinais clínicos da EAE;
4. Avaliar o efeito do receptor  $B_1$ , através da administração de agonista/antagonista durante a fase aguda da EAE;
5. Investigar alguns dos possíveis mecanismos relacionados ao efeito imunomodulador causado pelo bloqueio dos receptores  $B_1$  e  $B_2$  em todas as fases da EAE.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos C57BL/6 e com deleção gênica (nockouts) para os receptores  $B_1$  ( $B_1R^{-/-}$ ) e  $B_2$  ( $B_2R^{-/-}$ ) para as cininas, fêmeas, com idade de 6 – 12 semanas, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (LAFEX), Departamento de Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), além de livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo (06:00 - 18:00 horas). Todos os protocolos e procedimentos utilizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC, protocolo número 23080038266/2008-43).

#### 3.2 Indução da EAE

A EAE foi induzida pela inoculação de 100  $\mu\text{L}$  de emulsão contendo 200  $\mu\text{g}$  de glicoproteína de mielina do oligodendrócitos ( $\text{MOG}_{35-55}$ ), em adjuvante incompleto de Freund (CFA), suplementado com 300  $\mu\text{g}$  de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) H37Ra (Difco, Detroit, MI, USA), em ambos os lados dos flancos traseiros. Além disso, cada animal recebeu 300 ng de *Bordetella toxina pertussis* em 200  $\mu\text{L}$  de solução salina por via intraperitoneal no dia 0 e dia 2 pós-imunização. Este procedimento foi repetido após sete dias, a fim de aumentar a incidência de EAE, conforme metodologia descrita anteriormente (Stromnes e Goverman, 2006). Os animais foram pesados e examinados diariamente, durante 25 dias. Os sintomas da doença foram determinados por estágios conforme segue: sem sinais clínicos (estágio 0), perda do tônus da cauda (estágio 1), paralisia leve dos membros posteriores e dificuldade de endireitamento (estágio 2), paralisia severa dos membros posteriores e acometimento dos membros anteriores (estágio 3), tetraplegia e moribundos (estágio 4) ou morte (estágio 5) (vide Tabela 2). Os animais não foram classificados clinicamente antes do dia 7, desta forma os animais que responderam de forma aguda à imunização com  $\text{MOG}_{35-55}$  não foram incluídos na análise estatística deste estudo.

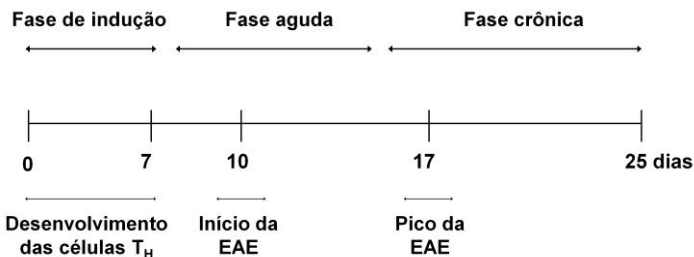
**Tabela 2. Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento da EAE.**

<b>Escore</b>	<b>Sinais clínicos</b>	<b>Observações</b>
0	Sem sinais	Os animais ficam com as patas posteriores estendidas; a cauda enrola no objeto cilíndrico; andar normal.
0,5	Perda parcial do tônus da cauda	Os animais ficam com as patas posteriores estendidas; ponta da cauda caída e/ou não enrola no objeto cilíndrico; andar normal.
1	Perda total do tônus da cauda	Os animais ficam com as patas estendidas; cauda caída e não enrola no objeto cilíndrico; andar normal.
2	Perda na coordenação dos movimentos, parestesia das patas posteriores.	Os animais contraem as patas posteriores quando são seguros pela cauda; os animais caminham com falta de coordenação nos movimentos; os animais apresentam reflexo nas patas quando apertadas; cauda sem tônus.
2,5	Uma das patas paralisadas	Os animais arrastam uma das patas; uma das patas não responde ao reflexo.
3	Patras posteriores paralisadas	Ambas as patas posteriores paralisadas; os animais arrastam ambas as patas posteriores e ambas não respondem ao reflexo.
3,5	Fraqueza nas patas anteriores	Patras posteriores arrastadas; patas dianteiras com dificuldades de mover o corpo; ambas as patas não respondem ao reflexo.
4	Paralisia das patas anteriores	Os animais não se movem; as patas posteriores e anteriores não respondem ao reflexo.
5	Moribundo/Morte	Morte. Nenhum movimento; frio ao toque, respiração alterada. Animais sacrificados.

### 3.3 Protocolos de tratamento

A fim de avaliar o efeito dos receptores cininérgicos B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> na modulação da EAE, os seguintes protocolos experimentais foram realizados: (1) Para determinar o efeito dos receptores de bradicinina durante a gênese da resposta autoimune induzida pela EAE (**fase de indução**), os animais foram tratados com agonista e antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>R, durante os dias 0 ao dia 5 pós-imunização; (2) Para avaliar o efeito dual do receptor B<sub>1</sub> em modular o desenvolvimento inicial da neuroinflamação induzida pela EAE (**fase**

**aguda**), os animais foram tratados durante 10 dias com agonista e antagonista do receptor B<sub>1</sub> (início do tratamento dia 7 até o dia 17 pós-*imunização*); e finalmente (3) a fim de analisar o papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em modular a manutenção da EAE, após o surgimento dos sinais clínicos (**fase crônica**), os animais foram tratados durante 5 dias, assim que os primeiros sinais da EAE apareceram, ou seja, do dia 15 até o dia 20 após a *imunização*. O esquema referente às diferentes fases de avaliação da EAE neste projeto encontra-se ilustrado na Figura 10. O antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradicinina (DALBK, 50 nmol/kg), o agonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (DABK, 300 nmol/kg), o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> o HOE-140 (150 nmol/kg) ou os seus respectivos veículos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.). A escolha das doses para cada droga foi baseada em experimentos pilotos ou em trabalhos publicados (Prediger *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011).



**Figura 10. Ilustração das três diferentes fases relacionadas com a gênese (fase de indução), desenvolvimento (fase aguda) e manutenção (fase crônica) da EAE durante o decurso temporal.** EAE, encefalomielite autoimune experimental; Th, linfócitos T *helper*.

### 3.4 Experimentos comportamentais

#### 3.4.1 Atividade locomotora

A atividade locomotora e a coordenação motora dos animais foram avaliadas utilizando o Rotarod. Neste teste os animais foram colocados em esteiras individuais a uma velocidade fixa de rotação de 4 rpm. O tempo máximo para cada ensaio foi fixado em 60 segundos. Os animais foram devidamente treinados durante três dias antes da indução da EAE. Em cada dia os animais foram colocados por três vezes consecutivas nas baias, até que o mesmo se mantivesse durante 60

segundos na esteira. Após a indução da EAE os animais foram avaliados a cada dois dias, até o vigésimo quinto dia pós-imunização.

### 3.4.2 Hipernocicepção mecânica

Filamentos de Von Frey foram utilizados para avaliar a hipersensibilidade mecânica após a indução da EAE. Os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico (9 x 7 x 11 cm) em plataformas de arame elevadas, as quais permitem o acesso à superfície ventral da pata traseira direita dos animais. A frequência de resposta de retirada foi avaliada após 10 aplicações (com intervalo de 3 segundos) dos filamentos de Von Frey (VFH, Stoelting, Chicago, IL, EUA). Os animais foram aclimatizados por 30 min antes do teste comportamental e a hipersensibilidade mecânica foi avaliada em diferentes tempos durante o desenvolvimento da EAE. O VFH de 0,4 g produz uma frequência média de retirada de 15%, o qual é considerado um valor adequado para a medida da hipernocicepção mecânica (Quintao *et al.*, 2005). Para determinar o limiar basal, todos os grupos foram avaliados antes da indução da doença. Todos os animais foram avaliados a cada dois dias até o dia 14, já que após este dia, o déficit locomotor apresentado pelos animais com EAE, impede a análise desses parâmetros.

### 3.5 Produção de citocinas em cultura de linfócitos e esplenócitos

Suspensões de linfócitos e esplenócitos foram obtidas dos linfonodos inguinais e baço, respectivamente, 25 dias pós-imunização. Resumidamente, os linfonodos inguinais e o baço foram individualmente macerados em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, HEPES (20 nM), 2-mercapto etanol, penicilina (100 U/mL) e estreptomomicina (100 mg/mL). Em seguida as suspensões celulares resultantes foram filtradas com a utilização de filtros de 70 µm e centrifugadas a 1500 g durante 7 min a 4°C. Para as suspensões celulares obtidas do baço, após a centrifugação inicial, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspensão com 1 mL de solução tampão contendo cloreto de amônio e carbonato de potássio (tampão de lise ACK) para lisar as células vermelhas do sangue. Após a incubação, 9 mL do meio RPMI 1640 foram adicionados para parar a lise celular. Em seguida a suspensão celular foi centrifugada a 500 g durante 5 min a 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio. As células do linfonodos e baço resultantes foram devidamente contadas e cultivadas

( $1 \times 10^6$  células/poço) na presença ou ausência de MOG<sub>35-55</sub> (10 µg/mL). Os linfócitos e esplenócitos foram incubados por 48 horas em câmara úmida, a 37°C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, os sobrenadantes da cultura foram coletados e armazenados em freezer a -70°C, até posterior análise. Os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , interleucina-17 (IL-17) e interleucina-4 (IL-4) foram determinados por ELISA, de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. Após a coleta dos sobrenadantes de cultura, as células foram utilizadas para o ensaio de citometria de fluxo.

### 3.6 Análise dos linfócitos por citometria de fluxo

Após a incubação com MOG<sub>35-55</sub>, os linfócitos obtidos dos linfonodos inguinais foram lavados com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e em seguida incubados com os anticorpos durante 20 min a 4°C. Neste protocolo experimental os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-CD4<sup>+</sup>-PerCP (clone RM4-5, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EUA), anti-CD8a<sup>+</sup>-APC (clone 5H10, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e anti-CD69-PE (clone H1.2F3, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, SanJose, CA, EUA). Os dados foram coletados utilizando Citômetro de Fluxo – FACS Canto II (BD Bioscience) e analisados através do programa Flowjo (versão 7.5).

### 3.7 Ensaio de proliferação celular

Linfócitos e esplenócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) obtidos a partir de camundongos imunizados (grupo EAE) e de animais nocautes para os receptores B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) e B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) foram cultivados na presença ou ausência de MOG<sub>35-55</sub> (10 µg/mL). Após 60 h, 0,5 µCi por poço de [<sup>3</sup>H] timidina foi adicionada a cada poço e incubada por mais 12 h. As células foram então coletadas em filtros de fibra de vidro, e a radioatividade foi avaliada no líquido de cintilação utilizando Cintilador Beta Counter LS5000TD (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EUA).

### 3.8 Análise histológica

Vinte e cinco dias após a indução da EAE, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 7% (8 mL/kg, i.p.) e perfundidos com solução de paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As medulas espinhais foram removidas e pós-fixadas por 24 h na mesma solução (PFA 4%), e em seguida embebidas em parafina após desidratação e diafanização, e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura. As análises histológicas dos focos inflamatórios e das áreas

de desmielinização foram realizadas com coloração de hematoxilina-eosina (H&E) e luxol fast blue (LFB), respectivamente. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, sendo que quatro campos oculares por corte (6-9 animais/grupo) foram capturados. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear das células inflamatórias (H&E) ou da área de mielina (LFB). Os dados foram expressos como densidade óptica (DO).

### **3.9 Análise imunoistoquímica**

A análise imunoistoquímica na medula espinhal dos animais foi realizada 25 dias após a indução da EAE, conforme descrito anteriormente (Dutra, R. *et al.*, 2011). Para tal, os tecidos dos animais foram coletados após processo de perfusão com solução fisiológica e PFA 4%, sendo mantidos nessa mesma solução durante 24 h. Posteriormente, foram realizadas secções transversais na região lombar da medula espinhal, seguidos de processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes teciduais de espessura de 5 µm foram montados sobre lâminas carregadas positivamente, preparadas através da imersão das mesmas em solução de silano (3-amino-propil-trietoxisilano; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona (v/v). Em seguida, as lâminas de vidro contendo os cortes histológicos foram mantidas em estufa, durante 1 h, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, para fixação dos mesmos. Após fixação, as lâminas foram desparafinizadas através de imersões consecutivas em xilol e re-hidratadas por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%), com posterior lavagem em água destilada. Em seguida realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, a fim de eliminar reações inespecíficas, com solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% em metanol absoluto (v/v), durante 20 min. Após lavagem das lâminas com água destilada, as amostras foram submetidas à reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos encobertos pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Por esta razão, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 durante 40 min, em banho-maria com temperatura ajustada para 95–98°C. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante

20 min à temperatura ambiente e lavada em água destilada e solução tampão fosfato (PBS). A imunodeteccção das proteínas de interesse foi realizada utilizando os seguintes anticorpos: anti-CD3<sup>+</sup> (1:100; Novocastra, Newcastle, Reino Unido), anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (1:600, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anti-molécula adaptadora de cálcio ionizado 1 (Iba-1) (1:200, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anti-neurofilamento H (1:200, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) e anti-CREB (1:300, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 12–18 h, a uma temperatura de 2–8°C. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS e os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo de acordo com o anticorpo primário (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) em câmara úmida durante 60 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com streptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA). Após 40 min de incubação das lâminas com a solução de streptavidina-biotina-peroxidase, as mesmas foram lavadas com PBS e a imunodeteccção foi completada utilizando-se uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahidrocloro) (DAB, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, foi realizada contracoloração das secções histológicas em solução de hematoxilina de Harris, desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente (Entellan, Merck, Frankfurt, Darmstadt, Germany). Os resultados foram documentados utilizando câmera digital (Sight DS-5ML1), acoplada a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY, USA). Para análise de cada reação antígeno-anticorpo, foram obtidas cinco imagens a partir dos cortes histológicos da medula espinhal de cada animal. A densidade óptica que melhor discriminou a imunomarcação (coloração castanha) foi obtida utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b. Para a análise dos níveis de GFAP, Iba-1, NF-H e fosfo-CREB a intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como densidade óptica (DO). A fim de avaliar o número de linfócitos T, as células T CD3<sup>+</sup> foram visualizadas e contadas na substância branca da medula espinhal, no aumento de 400x.



### 3.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

#### 3.10.1 Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos em 1 mL de reagente de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, SP, Brazil), conforme recomendações do fabricante. Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio ao homogenato, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12.000 g, durante 15 min a 4°C). Após a centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida submetido à centrifugação (12.000 g, 15 min, 4°C), sendo que o *pellet* formado foi ressuscitado em 1 mL de etanol gelado. O RNA foi novamente centrifugado (7.000 g, 5 min, 4°C), o etanol desprezado e o *pellet* dissolvido em água ultra-pura. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260/280 nm. O RNA total foi estocado em freezer a -70°C até o momento do uso.

#### 3.10.2 Confeção do DNA complementar (cDNA)

A fim de determinar a expressão do RNAm codificador para TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, receptor B<sub>1</sub>, ROR- $\gamma$ T e T-bet no SNC dos animais após a indução da EAE, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Para a reação da transcrição reversa, amostras contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µL de oligo dT, 1 µL do mix de dNTP (10 mM) em água ultra-pura para um volume final de 12 µL. Inicialmente, as amostras foram aquecidas por 5 min a 65°C, resfriadas por 5 min a 4°C e acrescidas de 4 µL de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM e MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 mM e 1 µL de inibidor de RNase (2500 U). Posteriormente, essa mistura foi incubada a 37°C durante 2 min e a enzima M-MLV (1 µL, 200 U) foi adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37°C por 50 min e a inativação da reação foi realizada através da incubação das amostras a 75°C durante 15 min. O cDNA foi estocado a 4°C até a realização da reação de RT-PCR.

### 3.10.3 RT-PCR

O cDNA foi amplificado em triplicada utilizando o kit Master Mix TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR, com sondas específicas para camundongos, com marcação 3<sup>o</sup> quencher MGB e FAM, para o TNF- $\alpha$  (Mm00443258\_m1), IFN- $\gamma$  (Mm99999071\_m1), IL-17 (Mm00439618\_m1), receptor B<sub>1</sub> (Mm00432059\_s1), ROR- $\gamma$ T (Mm00441144\_g1), T-bet (Mm00450960\_m1) e GAPDH (NM\_008084.2), utilizado como controle endógeno (*gene housekeeping*). A reação de PCR foi realizada em placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1  $\mu$ L de cDNA, 5  $\mu$ L de master mix, 0,5  $\mu$ L de primer e 3,5  $\mu$ L de água ultra-pura, em um volume final de 10  $\mu$ L. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 60 ciclos. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para a quantificação relativa.

### 3.11 Avaliação da permeabilidade da BHE

A permeabilidade da BHE foi avaliada através da medida do extravasamento do corante Evan's blue (EB), conforme previamente descrito (Zhang *et al.*, 2010). No dia 21 pós-imunização, os camundongos receberam 0,1 mL de EB 2% por via endovenosa, e mantidos em suas caixas por um período de 60 minutos. Após este período de circulação do corante, os animais foram devidamente perfundidos com solução salina (NaCl, 0,9%) a fim remover o excesso de corante intravascular. Em seguida, a porção lombar da medula espinhal foi coletada, triturada e incubada com 600  $\mu$ L de formamida a 60°C durante 24 h. Após o período de incubação, o tecido foi removido e a solução de formamida centrifugada a 20.000 g durante 20 min. A solução sobrenadante foi coletada e a densidade óptica determinada por leitura espectrofotométrica a 620 nm.

### 3.12 Cultura primária de astrócitos

A cultura de células gliais foi preparada de acordo com metodologia previamente descrita (Cohen e Wilkin, 1995). Camundongos C57BL/6 neonatos (1-3 dias pós-natal) foram devidamente decapitados e o córtex cerebral dissecado e incubado em solução tampão de Hank's (HBSS). Em seguida, o tecido cortical foi cortado grosseiramente e incubado em HBSS contendo tripsina 0,025%, albumina bovina sérica (BSA) 0,3% e DNase (40 mg/mL), durante 20 min a 37°C. Após incubação, a solução foi substituída por HBSS

contendo BSA/DNase, e o tecido triturado 20 vezes. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado (70  $\mu\text{m}$ ) e centrifugado a 1.000 rpm por 5 min. O *pellet* formado foi ressuspendido em 10 mL de meio DMEM, contendo 50 unidades de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina e 10% de BSA. As células em suspensão foram divididas em placas de 24 poços e cultivadas por 10 dias em câmara úmida, a 37°C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as placas foram mantidas sob agitação (120 rpm) por um período mínimo de 12 h. Em seguida as células em suspensão foram descartadas e os astrócitos aderentes foram identificados por imunofluorescência usando anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Por fim, astrócitos aderentes foram tratados com IFN- $\gamma$  (50 U/mL). DALBK (5  $\mu\text{M}$ ) e HOE-140 (5  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados na cultura por duas vezes, primeiramente 18 h antes do IFN- $\gamma$ , e em seguida, simultaneamente com o agente inflamatório. A cultura foi mantida por 48 h em câmara úmida, a 37°C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final do período de incubação, o sobrenadante foi coletado e os níveis de TNF- $\alpha$ , CXCL1/KC e IL-6 foram determinados. Além disso, os astrócitos foram coletados utilizando o protocolo do Trizol para avaliar a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2, Mm01307334\_g1), óxido nítrico sintase 2 (NOS-2, Mm1309898\_m1) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, Mm00432069\_m1). Os níveis de citocinas e a expressão do RNAm foram medidos por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA) e RT-PCR, conforme descrito anteriormente.

### 3.13 Reagentes e Drogas

Os reagentes toxina Pertussis, PBS, H&E, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IFA, antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradicinina (DALBK, 50 nmol/kg), agonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (DABK, 300 nmol/kg), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), aprotinina A, brometo de hexadecilmetilamônio (HTAB), estreptomicina, HEPES, penicilina, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), tetrametilbenzidina (TMB), deoxiribonuclease I (DNase), BSA, tripsina, Tween 20 e Tween 80 foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). O antagonista do receptor B<sub>2</sub>, HOE-140 foi obtido da Aventis (Frankfurt Main, Germany). Paraformaldeído, formamida, NH<sub>4</sub>Cl e KHCO<sub>3</sub> foram obtidos da Merck (Frankfurt, Darmstadt, Germany). O peptídeo MOG<sub>35-55</sub> (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) foi obtido da EZBiolab, Carmel, IN 46032, USA; e o *M. tuberculosis* H37Ra obtido da Difco

Laboratories, Detroit, MI, USA. O meio de cultura RPMI 1640, DMEN e BSA foram obtidos da GIBCO (Carlsbad, CA, EUA). [<sup>3</sup>H] timidina (0,5 mCi/mL) foi obtida da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Os kits de citocinas anti-TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, CXCL1/KC, IL-6 e IL-4 foram obtidos da R&D Systems. Anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD3<sup>+</sup> foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) e o anticorpo policlonal de cabra anti-Iba1 foi obtido da Abcam (Cambridge, MA, USA). O anticorpo monoclonal de camundongo anti- GFAP, anticorpo monoclonal de camundongo anti-neurofilamento H (NF-H) e policlonal de coelho anti-CREB foram adquiridos da Cell Signalling Technology (Danvers, MA, EUA). Anticorpo secundário Envision Plus<sup>TM</sup>, estreptavidina-HRP e o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) foram adquiridos da Dako Cytomation (Carpinteria, CA, EUA). Os primers para camundongos TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, receptor B<sub>1</sub>, ROR- $\gamma$ T, T-bet, COX-2, NOS-2, BDNF e GAPDH foram adquiridos da Applied Biosystems (Warrington, UK). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos de diferentes fontes comerciais.

### 3.14 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post hoc* de *Student Newman-Keuls*. Valores de P menores a 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram realizadas usando o software *Graphpad Prism 4* (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

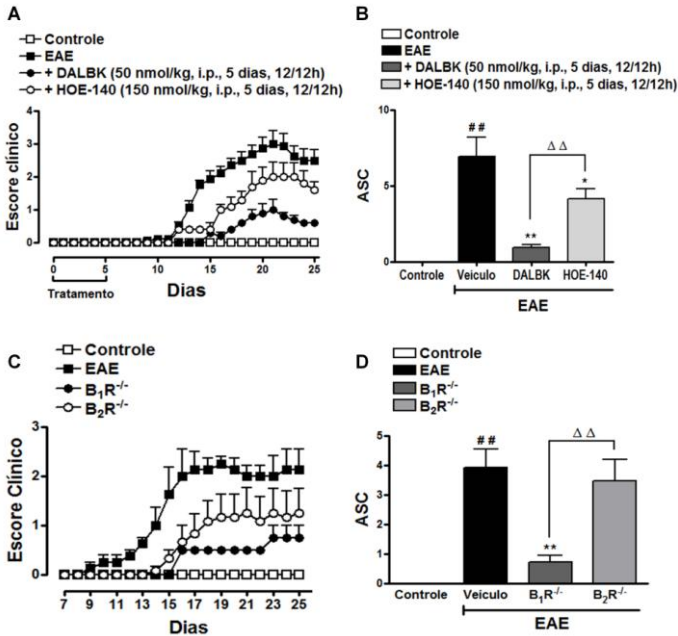
## 4 RESULTADOS

### 4.1 A deleção genética e/ou antagonismo dos receptores B<sub>1</sub> das cininas na fase de indução da EAE inibe os sinais clínicos e o desenvolvimento da EAE

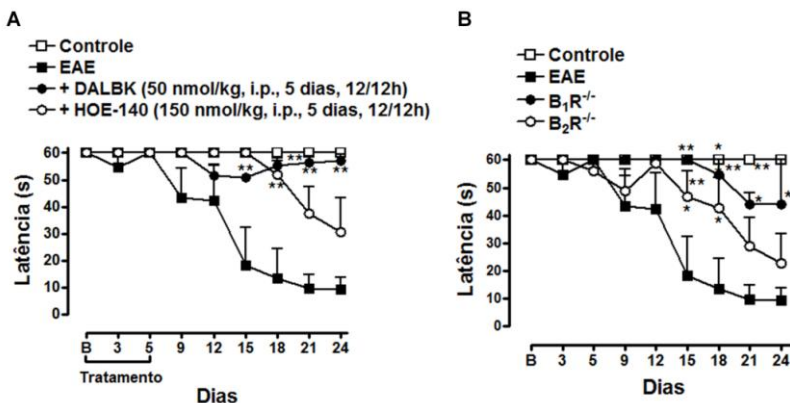
Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores das cininas na gênese da EAE, inicialmente os animais foram devidamente tratados com o antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradicinina (DALBK, 50 nmol/kg), ou com o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> o HOE-140 (150 nmol/kg) durante a fase de indução da doença, ou seja, entre os dias 0 e dia 5. Os antagonistas foram administrados por via i.p. com duas injeções diárias (12/12 horas), sendo que os animais foram avaliados até 25º dia pós-imunização. Os resultados da Figura 11 e 12 demonstram que os animais do grupo EAE apresentaram paralisia crescente a partir do 12º dia após a imunização (dia do surgimento dos sintomas:  $12 \pm 0,7$ ), atingindo o escore clínico máximo a partir do 19º dia (escore máximo:  $4 \pm 0,5$ ), o qual se manteve estável até o último dia de análise. O tratamento preventivo com o antagonista do receptor B<sub>1</sub>, a DALBK foi capaz de bloquear significativamente os sinais clínicos (Figura 11A e B), assim como o déficit locomotor (Figura 12A) induzido pela EAE, quando comparado com o grupo controle. Os animais tratados apresentaram os primeiros sintomas a partir do 15º após a imunização (dia do surgimento dos sintomas:  $15 \pm 0,5$ ), atingindo o escore clínico máximo de apenas  $1,5 \pm 0,2$  (Figura 11A). A análise da área sob a curva (ASC) obtida entre os dias 7-25 pós-imunização demonstrou inibição de  $75,8 \pm 5,2\%$  (Figura 11B). Vale ressaltar que esta diferença na severidade da EAE persistiu até o último dia de análise, de acordo com a atividade locomotora dos mesmos (Figura 12A).

Em seguida, para confirmar os nossos dados farmacológicos supracitados, animais com deleção gênica para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram imunizados com EAE. Como podem ser observados nas Figuras 11C, 11D e Figura 12B, os animais nocautes para o B<sub>1</sub>R não desenvolveram a EAE, sendo que nestes animais o dia de surgimento dos sintomas foi dia  $14 \pm 0,3$  com escore máximo de  $1,5 \pm 0,5$  (Figura 11C). Além disso, a análise da ASC demonstrou inibição de aproximadamente 70% no escore clínico dos animais nocautes para o B<sub>1</sub>R. Em contrapartida, o tratamento preventivo com o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> (HOE-140, i.p., 2x/dia, dia 0-5), ou a utilização

de animais com deleção gênica para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) somente causou efeito moderado em inibir o desenvolvimento da EAE (Figura 11). De modo interessante, o pré-tratamento dos animais com o antagonista do B<sub>1</sub>R ou o emprego de animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> apresentaram redução no escore clínico quando comparados com os animais tratados com o antagonista do receptor B<sub>2</sub>, assim como nos animais B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Estes dados sugerem que durante a fase de indução da EAE, os receptores B<sub>1</sub> parecem apresentar papel dominante em modular a severidade da EAE.



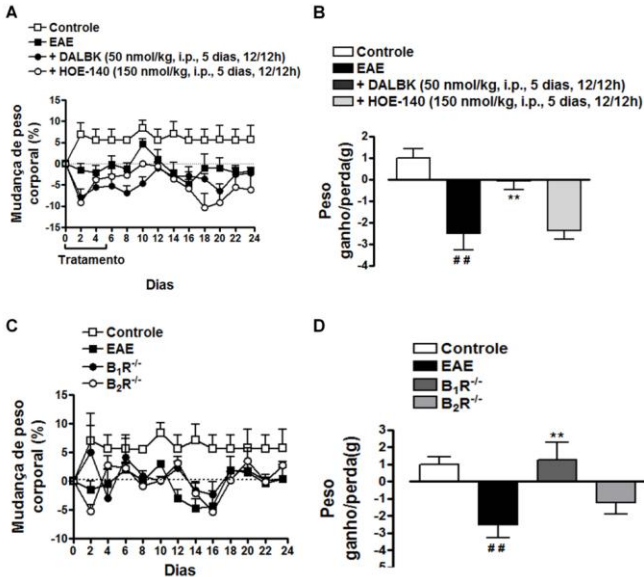
**Figura 11. Inibição ou a deleção dos receptores B<sub>1</sub> durante a fase de indução da EAE inibiu o desenvolvimento da doença.** Animais foram imunizados com uma mistura do peptídeo MOG<sub>35-55</sub> /CFA e toxina *Pertussis*. Escore clínico (A e C) e área sob a curva (ASC) (B e D) foram analisados no grupo controle sem EAE, no grupo com EAE, em animais previamente tratados com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R - DALBK (50 nmol/kg), em animais pré-tratados com o antagonista seletivo do B<sub>2</sub>R - HOE-140 (150 nmol/kg), ou em camundongos nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, por um período de 25 dias pós-imunização. Os antagonistas foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 0-5). Os dados são apresentados como média ± EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de três experimentos independentes. #p<0,05 e ##p<0,001 versus o grupo controle, \*p<0,05 e \*\*p<0,001 versus o grupo EAE, Δp<0,05 e ΔΔp<0,001 versus o tratado com DALBK ou animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).



**Figura 12. A deleção gênica ou o pré-tratamento dos animais com o antagonista do receptor  $B_1$  preveniu o déficit locomotor induzido pela EAE.** Animais foram imunizados com o peptídeo MOG<sub>35-55</sub> /CFA e toxina *Pertussis*. Atividade locomotora (A e B) foi analisada no grupo controle, no grupo com EAE, em animais previamente tratados com o antagonista do  $B_1R$  - DALBK (50 nmol/kg), em animais pré-tratados com o antagonista do  $B_2R$  - HOE-140 (150 nmol/kg), ou em camundongos nocautes  $B_1R^{-/-}$  e  $B_2R^{-/-}$ , durante 25 dias. Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 0-5). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Outra importante manifestação clínica apresentada pelos animais com EAE é a crescente perda de peso corporal, podendo esta ser facilmente observada à medida que a doença evolui. De acordo com a Figura 13, pode-se observar que os animais tratados com EAE apresentaram redução do peso corporal já nos primeiros dias após a imunização (Figura 13A e C), e durante o pico máximo da doença (16<sup>o</sup> - 18<sup>o</sup> dia após a imunização) os animais com EAE apresentam uma maior perda de peso em relação ao ganho (Figura 13B e D). Ao contrário, os animais do grupo controle (sem EAE) apresentaram ganho de peso corporal durante os 25 dias de análise (Figura 13). Além disso, os animais tratados com os antagonistas seletivos para os receptores  $B_1$  e  $B_2$ , assim como os respectivos animais nocautes ( $B_1R^{-/-}$  e  $B_2R^{-/-}$ ) apresentaram variação de peso corporal similar aos animais do grupo EAE (Figura 13A e C). No entanto, considerando a proporção de ganho de massa corporal em relação à perda no pico da doença, nos animais tratados com DALBK ou nos animais  $B_1R^{-/-}$  pode-se observar diminuição na perda de peso corporal quando comparado aos animais do

grupo EAE (Figura 13B e D). Em contrapartida, nos animais tratados com HOE-140 ou nos animais  $B_2R^{-/-}$  a restauração do peso corporal não foi observada (Figura 13B e D).

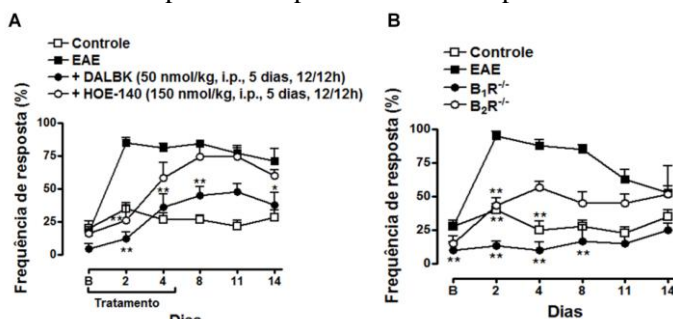


**Figura 13. Inibição ou a deleção gênica dos receptores  $B_1$  reduziu a perda de peso corporal induzida pela EAE.** Animais foram imunizados com o peptídeo MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *Pertussis* e avaliados durante 25 dias. Variação de peso corporal (A e C) e proporção ganho/perda de peso no pico da doença (16° - 18° dia após a imunização) (B e D) foram analisadas no grupo controle, no grupo com EAE, em animais previamente tratados com o antagonista seletivo do  $B_1R$  - DALBK (50 nmol/kg), em animais pré-tratados com o antagonista seletivo do  $B_2R$  - HOE-140 (150 nmol/kg), ou em camundongos nocautes  $B_1R^{-/-}$  e  $B_2R^{-/-}$ . Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 0-5). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de três experimentos independentes. . # $p < 0,05$  e ## $p < 0,001$  versus o grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Conforme descrito na introdução deste trabalho, os principais sintomas associados com a EM com a resposta autoimune exacerbada contra os antígenos de mielina, assim como prejuízos locomotores e sensoriais importantes. No entanto, dados recentes demonstraram que a dor crônica afeta entre 50 – 80% dos pacientes com EM, sendo este sintoma de extrema relevância clínica nos pacientes (Svendsen *et al.*, 2003). Porém, até o presente momento, poucos estudos investigaram os



mecanismos envolvidos na dor crônica dos pacientes com EM. Além disso, diversos estudos têm demonstrado o importante papel desempenhado pelas cininas e seus receptores na modulação da dor inflamatória, assim como na dor neuropática (Calixto *et al.*, 2004). Por esta razão, o próximo objetivo deste trabalho foi investigar se a inibição dos receptores das cininas durante a fase de indução da EAE poderia inibir também a dor neuropática associada à doença. Como ilustrado na Figura 14, a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE foi caracterizada por aumento acentuado e duradouro na frequência de resposta à estimulação com o filamento de Von Frey (0,4 g) na pata direita traseira dos animais. A hiperalgesia mecânica foi evidente já a partir do segundo dia, atingiu o pico máximo de resposta no dia 4 e permaneceu elevada durante os 14 dias de análise (Figura 14A e B). O tratamento dos animais com a DALBK ou com HOE-140 inibiu de forma significativa a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE, com inibição de  $66 \pm 2\%$  e  $40 \pm 2\%$ , respectivamente (Figura 14A). No entanto, apenas a deleção do gene para o receptor  $B_1$  (camundongo  $B_1R^{-/-}$ ) causou redução significativa na hiperalgesia mecânica induzida pela EAE (Figura 14B). Uma ressalva necessária é que neste protocolo, os animais foram avaliados apenas até o 14º dia após-imunização, já que a partir deste dia, o déficit locomotor apresentado pelos animais compromete as análises.

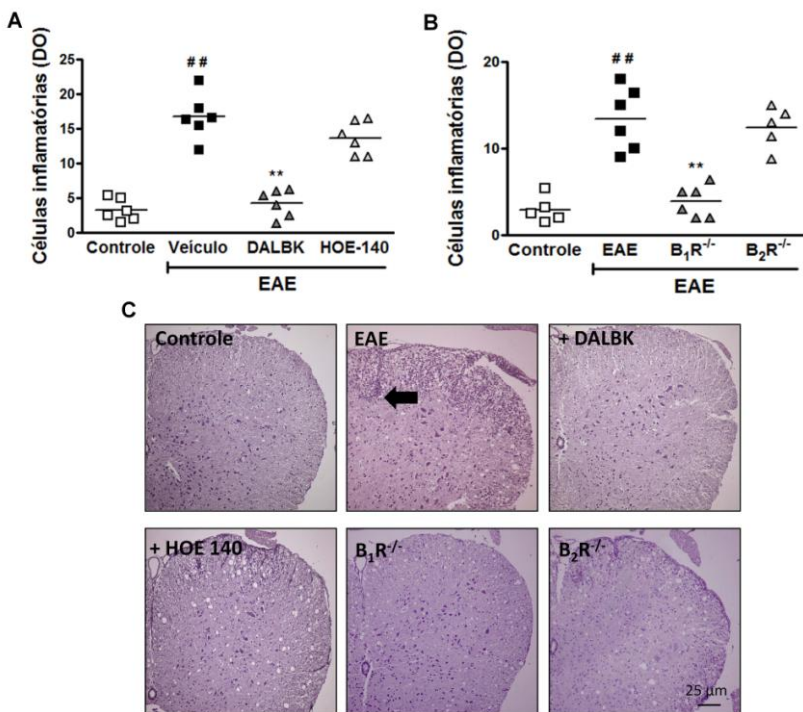


**Figura 14. O bloqueio dos  $B_1R$  e  $B_2R$  inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE.** Hiperalgesia mecânica (A e B) foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, em animais previamente tratados com DALBK (50 nmol/kg), em animais pré-tratados com HOE-140 (150 nmol/kg) (A), ou em camundongos nocautes  $B_1R^{-/-}$  e  $B_2R^{-/-}$  (B). Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 0-5). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

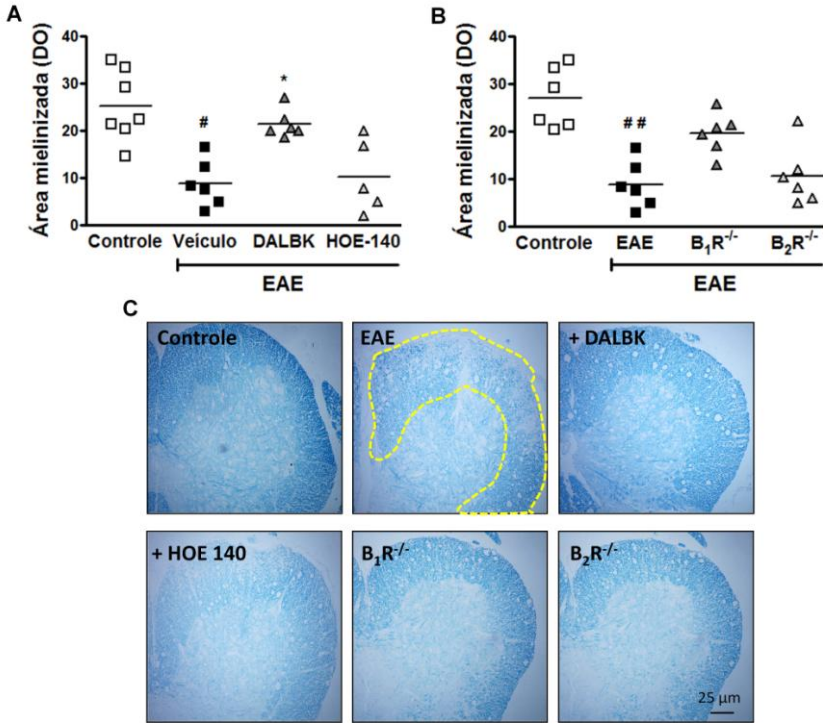
## 4.2 O bloqueio do receptor B<sub>1</sub> durante a fase de indução da EAE diminui a resposta neuroinflamatória e a perda de mielina no SNC

A patogênese da EM incluem infiltração de linfócitos T auto-reativos e macrófagos para o SNC, assim como a ativação de células gliais residentes, as quais em conjunto induzem a morte de oligodendrócitos e a desmielinização (Bjartmar *et al.*, 2003; Mcfarland e Martin, 2007). Estudos prévios sugerem que a inibição da ativação de células gliais e/ou a depleção de macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> parecem melhorar a severidade da EAE (Polfliet *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2007; Stromnes *et al.*, 2008). Além disso, dados recentes sugerem que os receptores de cininas parecem modular a resposta inflamatória existentes em diversas patologias (Souza *et al.*, 2004). Por esta razão, a próxima etapa deste projeto foi avaliar o potencial dos receptores de cininas em inibir o desenvolvimento da resposta neuroinflamatória e a desmielinização na medula espinhal dos animais após a indução da EAE.

O número de células inflamatórias no SNC, assim como a área de desmielinização foram avaliados nos seguintes grupos: controle, EAE, DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia), HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x dia) e nos animais nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> após 25 dias de imunização. Conforme ilustrado nas Figuras 15 e 16, as análises histológicas das medulas espinhais de animais controles mostram níveis muito discretos de células inflamatórias (Figura 15), com ausência de área de desmielinização (Figura 16). No entanto, após 25 dias de imunização, os animais do grupo com EAE apresentaram grande infiltração de células polimorfonucleares na medula espinhal (Figura 15). Tal infiltrado inflamatório foi acompanhado de significativa desmielinização da substância branca da medula espinhal (Figura 16). De forma significativa, o tratamento dos animais com DALBK (50 nmol/kg, i.p., 20x/dia) durante a fase de indução da EAE (dia 0 – dia 5) reduziu a resposta inflamatória na substância branca da medula espinhal (Figura 15A e C). Além disso, este mesmo tratamento restaurou os níveis de mielina, quando comparado com os animais do grupo EAE (Figura 16A e C). Confirmando os dados farmacológicos, os animais nocautes para o B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) apresentaram redução significativa no número de células inflamatórias na medula espinhal (Figura 15B e C), assim como também foi observado restauração da bainha de mielina (Figura 16B e C).



**Figura 15. O bloqueio do B<sub>1</sub>R inibiu o número de células inflamatórias no SNC após a indução da EAE.** (A e B) O número de células inflamatórias foi analisado no grupo controle, no grupo EAE, em animais previamente tratados com DALBK (50 nmol/kg), em animais pré-tratados com HOE-140 (150 nmol/kg), ou em camundongos nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 0-5). (C) Células inflamatórias foram visualizadas histologicamente (coloração H&E) em fragmentos lombares da medula espinhal obtidos no 25º dia pós-imunização. A quantificação foi baseada em uma média de quatro campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 6-9 animais/grupo. Barra de escala corresponde a 25 μm. Detalhe: foco inflamatório presente no grupo EAE. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média ± EPM e são representativos de três experimentos independentes. #p<0,05 e ##p<0,001 versus o grupo controle, \*p<0,05 e \*\*p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

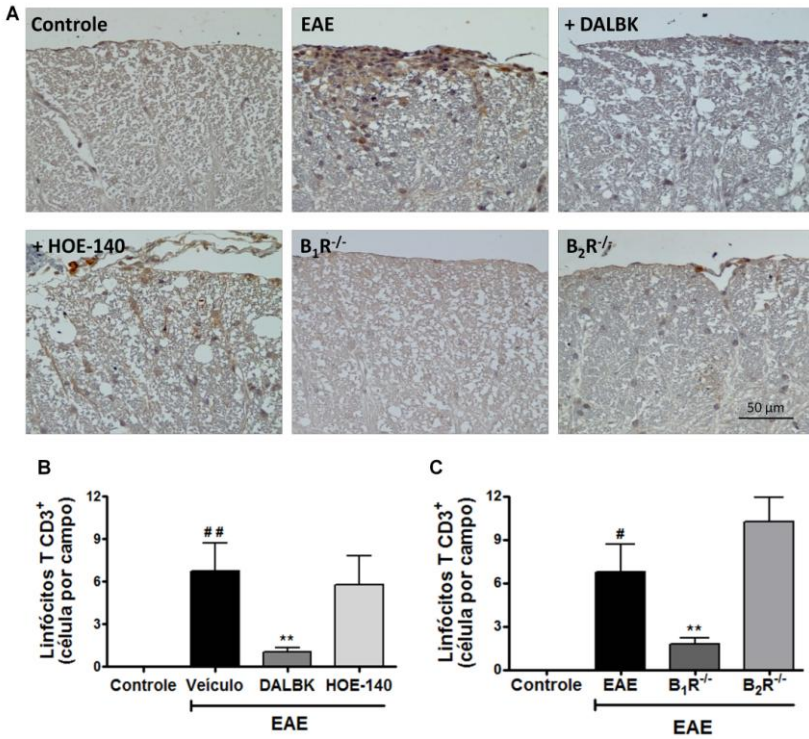


**Figura 16. O bloqueio do B<sub>1</sub>R inibiu as áreas de desmielinização no SNC após a indução da EAE.** (A e B) A área mielinizada foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, em animais previamente tratados com DALBK (50 nmol/kg), em animais pré-tratados com HOE-140 (150 nmol/kg), ou em camundongos nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 0-5). (C) Bainha de mielina foi visualizada histologicamente (coloração LFB) em fragmentos lombares da medula espinal obtidos no 25º dia pós-imunização. A quantificação foi baseada em uma média de quatro campos oculares da substância branca da medula espinal de um total de 6-9 animais/grupo. Barra de escala corresponde a 25 μm. Detalhe: marcação da área de desmielinização significativa no grupo EAE. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média ± EPM e são representativos de três experimentos independentes. #p<0,05 e ##p<0,001 versus o grupo controle, \*p<0,05 e \*\*p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

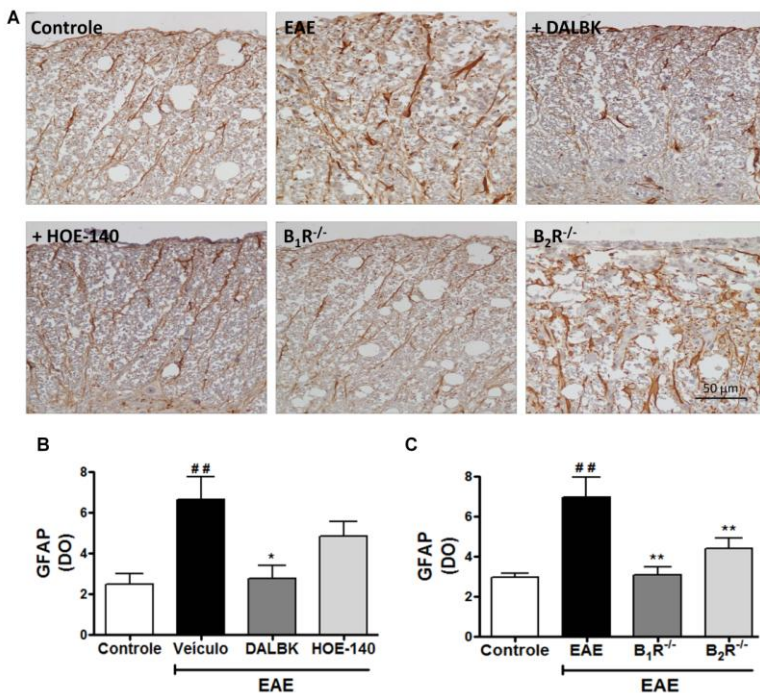
A fim de investigar outras células inflamatórias que poderiam estar envolvidas na mediação dos efeitos antiinflamatórios observados para o antagonista B<sub>1</sub> DALBK, ou mesmo nos animais nocautes para o

B<sub>1</sub>R, optou-se pelo ensaio de imunistoquímica para avaliar o efeito dos receptores de cininas no número de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e na ativação de astrócitos no SNC após a indução da EAE. Na figura 17A estão demonstradas as fotos representativas das imunomarcações para os linfócitos T CD3<sup>+</sup> na substância branca da medula espinhal. Como esperado, a indução da EAE resultou no aumento significativo do número de células CD3<sup>+</sup> quando comparado com os animais do grupo controle (sem EAE) (Figura 17). De modo interessante, o tratamento sistêmico com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R (DALBK, 50 nmol/kg, i.p., 2x/dia) durante a fase de indução (Figura 17A e B) ou a utilização dos animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> (Figura 17A e C) reduziu significativamente o número de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, tanto na região superficial quanto na região profunda da substância branca na medula espinhal após 25 dias. Ainda, as porcentagens de inibição observadas para o número de células CD3<sup>+</sup> foram de 80 e 71%, respectivamente para o tratamento com DALBK e no B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> (Figura 17B e C).

Com relação à ativação dos astrócitos, na Figura 18A estão representadas as fotos ilustrativas das imunomarcações para GFAP na região lombar da medula espinhal. Semelhante ao que foi observado para o número de linfócitos CD3<sup>+</sup>, observou-se aumento significativo na expressão de GFAP na substância branca dos animais do grupo EAE, quando comparado com os níveis basais visualizado no grupo controle (Figura 18A). De modo relevante, o tratamento preventivo com a DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0 – 5) (Figura 18A e C), ou a deleção gênica do B<sub>1</sub>R (Figura 18A e C), preveniu significativamente a ativação dos astrócitos na medula espinhal, quando avaliado 25 dias após a indução da EAE. Além disso, as porcentagens de inibição observadas para ambos os grupos quanto à expressão do GFAP foram de 58 e 54% na medula espinhal, respectivamente (Figura 18B e C).



**Figura 17. O bloqueio do B<sub>1</sub>R inibiu o número de células CD3<sup>+</sup> no SNC após a indução da EAE.** (A) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinhal. (B e C) O número de células CD3<sup>+</sup> foi analisado no grupo controle, no grupo EAE, DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5), HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5), ou em camundongos nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,001$  versus o grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

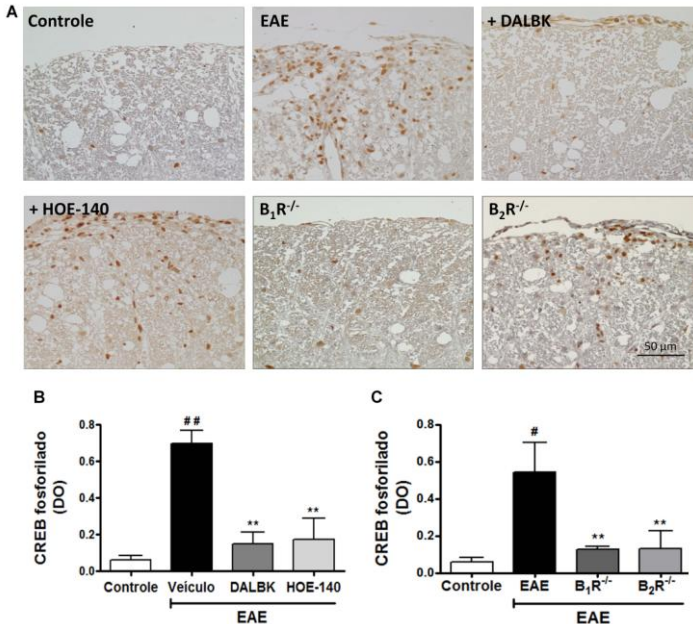


**Figura 18. O bloqueio do B<sub>1</sub>R inibiu a ativação de astrócitos no SNC após a indução da EAE.** (A) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinal. (B e C) A expressão de GFAP foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5), HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5), ou em camundongos nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. ## $p$ <0,001 versus o grupo controle, \* $p$ <0,05 e \*\* $p$ <0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newmann-Keuls).

### 4.3 Papel das cininas sobre a expressão do fator de transcrição CREB na medula espinal de camundongos com EAE

Dados recentes sugerem que durante o desenvolvimento da EAE, o fator de transcrição de ligação responsiva ao AMPc - CREB (*phospho-cyclic AMP response element binding protein*) encontra-se fosforilado e aumentando na medula espinal dos animais (Kim *et al.*, 2007), o qual contribui para a ativação de macrófagos e microglia, aumento das moléculas co-estimulatórias e do MHC (Gobin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007). Assim, o próximo objetivo deste trabalho foi avaliar o

papel dos receptores das cininas na ativação do fator de transcrição CREB na substância branca da medula espinal. Como ilustrado na Figura 19, a indução da EAE resultou no aumento significativo da fosforilação do CREB na substância branca da medula espinal. O tratamento preventivo com a DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5) (Figura 19A e B) ou a utilização dos animais  $B_1R^{-/-}$  (Figura 19A e C), bloqueou de forma significativa a fosforilação do CREB na substância branca da medula espinal 25 dias pós-imunização. Além disso, de modo interessante, o tratamento sistêmico com o HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5) (Figura 19A e B) ou a deleção gênica do receptor  $B_2$  ( $B_2R^{-/-}$ ) (Figura 19A e C), preveniu significativamente o aumento da fosforilação do fator de transcrição CREB na substância branca da medula espinal 25 dias pós-imunização.

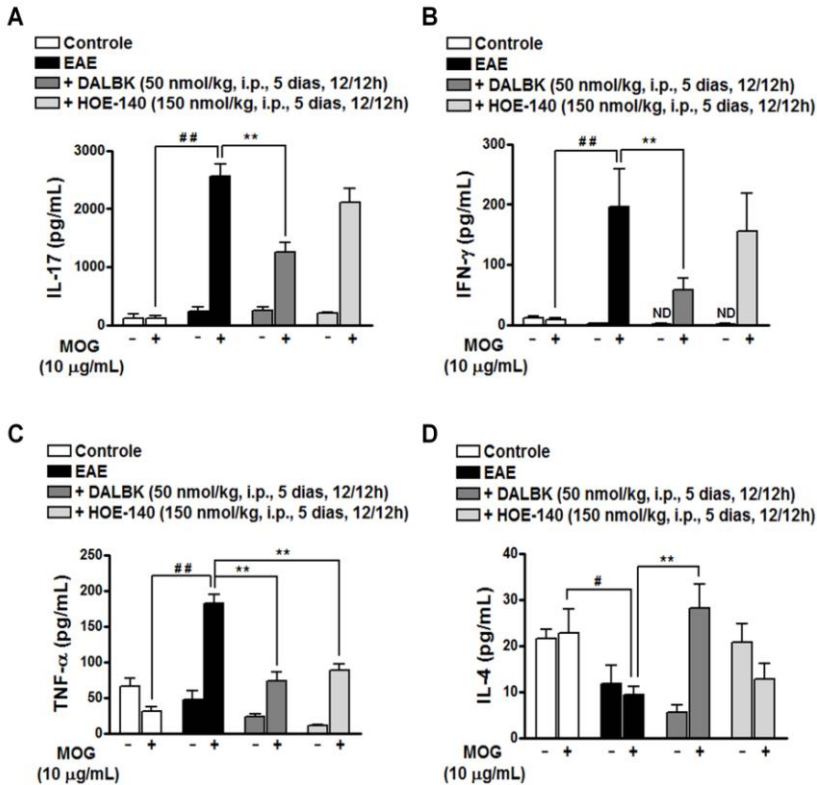


**Figura 19. O bloqueio dos receptores  $B_1$  e  $B_2$  preveniu a ativação do fator de transcrição CREB após a indução da EAE.** (A) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinal. (B e C) A expressão de CREB foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5), HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5), ou em camundongos nocautes  $B_1R^{-/-}$  e  $B_2R^{-/-}$ . Barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. <sup>#</sup> $p < 0,05$  e <sup>##</sup> $p < 0,001$  versus o grupo controle, <sup>\*</sup> $p < 0,05$  e <sup>\*\*</sup> $p < 0,001$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

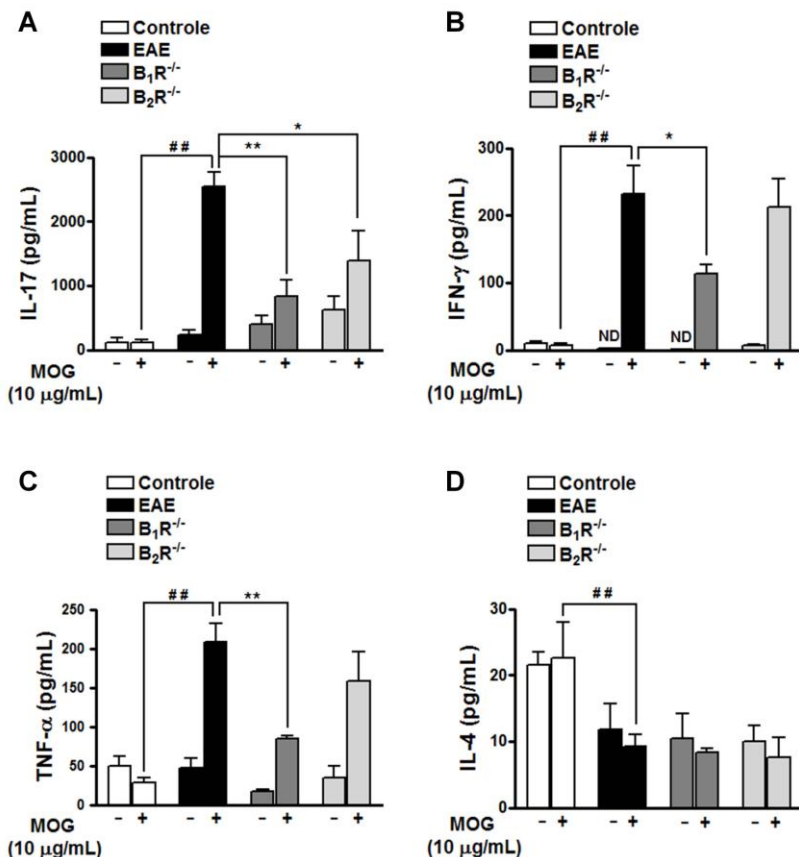


#### 4.4 O bloqueio do B<sub>1</sub>R na fase de indução da EAE limita a expansão/ativação/proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> assim como a produção de citocinas efetoras em tecidos linfóides periféricos

Trabalhos recentes sugerem que a extensão da resposta neuroinflamatória durante a EAE está diretamente associada com a ativação periférica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Goverman, 2009). Por esta razão, a próxima etapa deste projeto foi avaliar a participação dos receptores das cininas na modulação da resposta imunológica em tecidos linfóides periféricos. Assim, 25 dias após da indução da EAE, células dos linfonodos inguinais foram obtidas dos animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> ou de camundongos tratados previamente com a DALBK (50 nmol/kg, i.p., dia 0-5) ou HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., dia 0-5). Em seguida, os linfócitos foram re-estimulados *in vitro* com MOG<sub>35-55</sub> e analisados para a produção de citocinas e expressão de CD69, marcador de ativação de células T. Como pode ser observado nas Figuras 20 e 21, após a coleta do sobrenadante, os níveis das citocinas IL-17 (Figura 20A e 21A), IFN- $\gamma$  (Figura 20B e 21B) e TNF- $\alpha$  (Figura 20C e 21C) foram aumentados significativamente após a re-ativação *in vitro* com MOG<sub>35-55</sub> no grupo EAE. De maneira interessante, os níveis de IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram reduzidos nos linfócitos reativos a MOG isolados dos animais pré-tratados com a DALBK (50 nmol/kg, i.p.) (Figura 20A - C), ou nos animais nocautes (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) (Figura 21A - C). Além disso, o pré-tratamento com o HOE-140 ou a utilização dos animais B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> produziu diminuição discreta apenas nos níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 20C) e IL-17 (Figura 21A), respectivamente. Adicionalmente, de maneira significativa o bloqueio do B<sub>1</sub>R (Figura 20D) durante a fase de indução restaurou os níveis de IL-4 nas células obtidas dos linfonodos após a re-ativação *in vitro* quando comparado com os linfócitos isolados do grupo com EAE, os quais apresentaram níveis muito baixos de IL-4. Entretanto os níveis de IL-4 nos animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> não foram restaurados (Figura 21D).



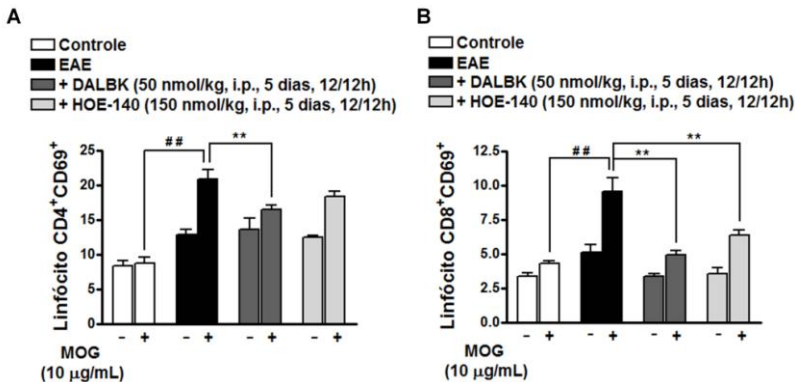
**Figura 20. O bloqueio do receptor B<sub>1</sub> reduziu a produção de citocinas encefalitogênicas nos linfonodos inguinais.** Os níveis de IL-17 (A), IFN- $\gamma$  (B), TNF- $\alpha$  (C), e IL-4 (D) foram avaliados no sobrenadante dos linfócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) obtidos 25 dias após a imunização do grupo controle, EAE, de animais previamente tratados com DALBK (50 nmol/kg) ou com HOE-140 (150 nmol/kg) cultivados na presença ou ausência de MOG<sub>35-55</sub> (10 µg/mL). N.D., níveis não detectados. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de dois experimentos independentes. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,001$  versus o grupo controle com MOG<sub>35-55</sub>, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  versus o grupo EAE com MOG<sub>35-55</sub> (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).



**Figura 21. O bloqueio do receptor B<sub>1</sub> inibiu a produção de citocinas encefalitogênicas nos linfonodos inguinais.** Os níveis de IL-17 (A), IFN-γ (B), TNF-α (C), e IL-4 (D) foram avaliados no sobrenadante dos linfócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) obtidos 25 dias após a imunização do grupo controle, EAE, ou de camundongos nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> cultivados na presença ou ausência de MOG<sub>35-55</sub> (10 μg/mL). N.D., níveis não detectados. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de dois experimentos independentes. ##*p*<0,001 versus o grupo controle com MOG<sub>35-55</sub>, \**p*<0,05 e \*\**p*<0,001 versus o grupo EAE com MOG<sub>35-55</sub> (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

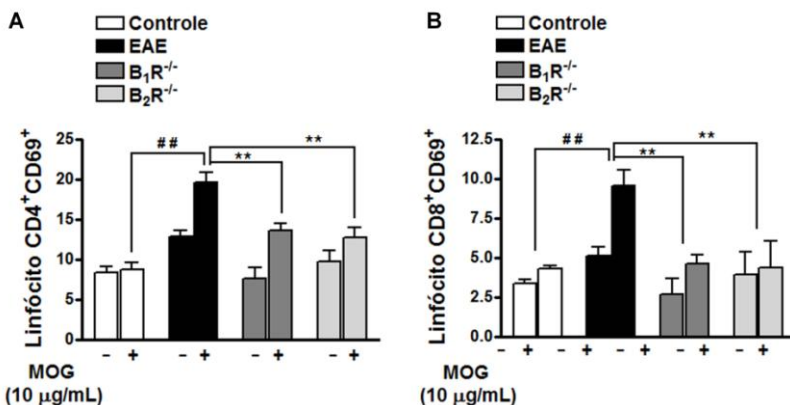
Após a coleta do sobrenadante para a dosagem das citocinas Th1, Th17 e Th2, conforme descrito acima, os linfócitos foram coletados e analisados por citometria de fluxo quanto à expressão do

marcador de ativação CD69. De acordo com as Figuras 22 e 23, o modelo de EAE induziu aumento significativo na ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Figura 22A e 23A) e CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Figura 22B e 23B), após a re-ativação *in vitro* com MOG<sub>35-55</sub> no grupo EAE. De forma significativa, o pré-tratamento com o antagonista do B<sub>1</sub>R, a DALBK, durante a fase de indução da EAE, diminuiu os níveis de ativação dos linfócitos CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Figura 22A) e CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Figura 22B), resultando em uma porcentagem de inibição de 30 e 47%, respectivamente. O tratamento com HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5) inibiu de maneira significativa apenas a ativação dos linfócitos CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Figura 22B).



**Figura 22. O bloqueio dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> reduziu os níveis de ativação dos linfócitos CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> nos linfonodos inguinais.** Linfócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) obtidos 25 dias após a imunização do grupo controle, EAE, de animais previamente tratados com DALBK (50 nmol/kg) ou com HOE-140 (150 nmol/kg) foram cultivados na presença ou ausência de MOG<sub>35-55</sub> (10 µg/mL) por 3 dias; os níveis de expressão de CD69<sup>+</sup> em linfócitos CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de dois experimentos independentes. <sup>###</sup>p<0,001 versus o grupo controle com MOG<sub>35-55</sub>, \*p<0,05 e \*\*p<0,001 versus o grupo EAE com MOG<sub>35-55</sub> (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

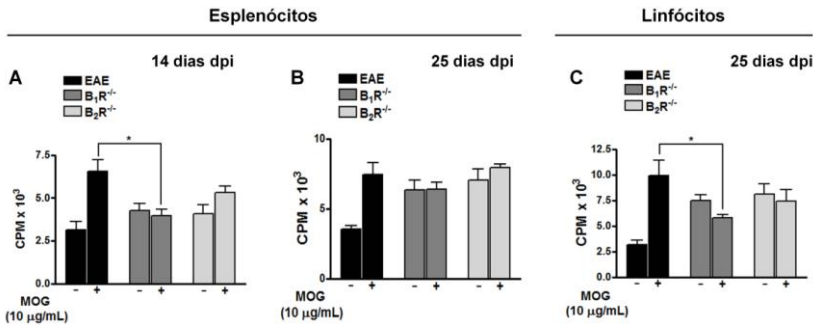
Em seguida, confirmando os dados farmacológicos, os animais nocautes para o B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) e para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) apresentaram redução significativa no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Figura 23A) e CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Figura 23B) ativados no tecido linfóide periférico, quando comparado com os animais do grupo EAE.



**Figura 23.** A deleção gênica dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> reduziu os níveis de ativação dos linfócitos CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> nos linfonodos inguinais. Linfócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) obtidos 25 dias após a imunização do grupo controle, EAE, ou de camundongos nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> foram cultivados na presença ou ausência de MOG<sub>35-55</sub> (10 µg/mL) por 3 dias; os níveis de expressão de CD69<sup>+</sup> em linfócitos CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de dois experimentos independentes. <sup>##</sup>p<0,001 versus o grupo controle com MOG<sub>35-55</sub>, \*p<0,05 e <sup>\*\*</sup>p<0,001 versus o grupo EAE com MOG<sub>35-55</sub> (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

Estudo recente demonstrou que células T CD4<sup>+</sup> são ativadas na periferia por células apresentadoras de antígenos (APCs) via MHC de classe II, que por sua vez, aumentam sua resposta proliferativa e conseqüentemente migram para o espaço subaracnóideo, resultando na formação de grandes agregados de linfócitos T no SNC (Kivisakk *et al.*, 2009). Por esta razão, a próxima etapa deste projeto foi avaliar a participação dos receptores de cininas na resposta proliferativa de células T em tecidos linfóides periféricos. Para isso, esplenócitos e linfócitos foram obtidos do grupo EAE, ou de camundongos nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, 14 e 25 dias após a indução da EAE. Como ilustrado na Figura 24, a indução da EAE induziu aumento significativo na proliferação de esplenócitos (Figura 24A e B) e de linfócitos (Figura 24C), após a re-ativação *in vitro* com MOG<sub>35-55</sub>, tanto no 14º dia como no 25º após a indução da EAE. De forma interessante, o bloqueio do B<sub>1</sub>R reduziu a resposta proliferativa no baço apenas no 14º dia (Figura 24A) e no linfonodos no 25º (Figura 24C) após a indução da EAE. Em conjunto, os nossos dados sugerem que o bloqueio dos receptores das

cininas, especialmente o B<sub>1</sub>R, durante a fase de indução da EAE, bloqueia o desenvolvimento da doença por diminuir a expansão/ativação/proliferação de linfócitos pró-encefalitogênicos Th1 e Th17, além de aumentar o número de linfócitos antiinflamatórios Th2 no tecido linfóide periférico.

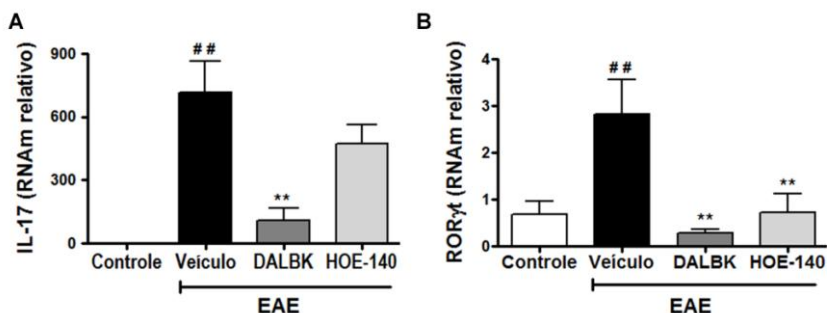


**Figura 24. A deleção gênica do B<sub>1</sub>R diminuiu a proliferação de esplenócitos e linfócitos após a indução da EAE.** Esplenócitos e linfócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) obtidos no 14<sup>o</sup> (A) e 25<sup>o</sup> (B e C) dia, a partir do grupo EAE e de animais nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> foram cultivados na presença ou ausência de MOG<sub>35-55</sub> (10 µg/mL), respectivamente. Após 60 h, 0,5 µCi por poço de [<sup>3</sup>H] timidina foi adicionada a cada poço e incubada por mais 12 h. Os dados são apresentados como média ± EPM e são representativos de dois experimentos independentes. \*p<0,05 versus o grupo EAE com MOG<sub>35-55</sub> (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

#### 4.5 Inibição do B<sub>1</sub>R na fase de indução da EAE suprimiu os linfócitos Th17 e Th1 no SNC

Crescentes evidências sugerem que as células Th17 e Th1, controlam a resposta neuroinflamatória na EM (Moldovan *et al.*, 2003; Stromnes *et al.*, 2008; Tzartos *et al.*, 2008). Os linfócitos Th17 produzem principalmente a citocina IL-17A mediado pela ativação do fator de transcrição do receptor órfão relacionado ao ácido retinóico gama (ROR-γT), enquanto que as células Th1 são caracterizadas pela produção de IFN-γ e TNF-α, sendo que sua diferenciação é orquestrada pelo fator de transcrição T-bet (Bettelli *et al.*, 2008). Por esta razão, o próximo objetivo deste trabalho foi avaliar se os receptores de cininas poderiam modular a resposta neuroinflamatória, através da modulação de linfócitos Th17 e Th1, após a indução da EAE. Como pode ser observado na Figura 25, à indução da EAE resultou no aumento

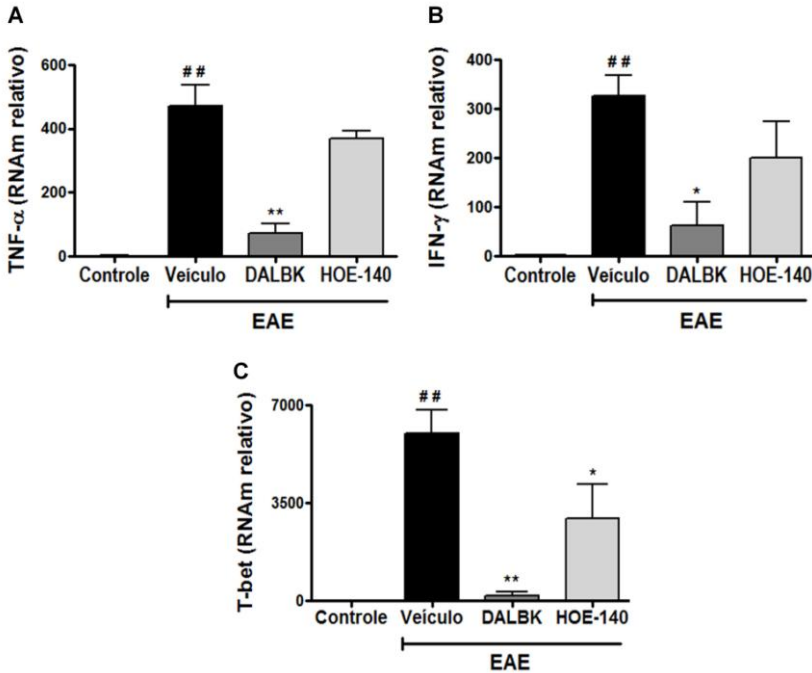
significativo nos níveis de RNAm para a citocina IL-17A (Figura 25A) e para o fator de transcrição ROR- $\gamma$ T (Figura 25B) na medula espinhal 25 dias após a indução. Em contrapartida, o pré-tratamento dos animais com a DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5) reduziu, de forma significativa, a expressão de IL-17 (Figura 25A) e de ROR- $\gamma$ T (Figura 25B) no SNC, com porcentagens de inibição de 83 e 88%, respectivamente. Por outro lado, o pré-tratamento com o HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., dia 0-5) foi capaz de reduzir apenas a expressão do fator de transcrição ROR- $\gamma$ T (Figura 25).



**Figura 25. O pré-tratamento com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R inibiu os linfócitos CD4<sup>+</sup> Th17 no SNC após a indução da EAE.** Os níveis de RNAm para IL-17A (A) e ROR- $\gamma$ T (B) foram avaliados por RT-PCR. O RNAm total foi extraído da medula espinhal, porção lombar, de animais do grupo controle, EAE, de animais previamente tratados com DALBK (50 nmol/kg) ou com HOE-140 (150 nmol/kg). O RNAm para GAPDH foi utilizado para normalizar a quantidade relativa de RNAm. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. <sup>##</sup>p<0,001 versus o grupo controle, \*p<0,05 e <sup>\*\*</sup>p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Com relação ao número de células CD4<sup>+</sup> Th1 no SNC, na Figura 26 estão demonstrados os níveis de RNAm para o TNF- $\alpha$  (Figura 26A), IFN- $\gamma$  (Figura 26B) e para o fator de transcrição T-bet (Figura 26C). Após a indução da EAE, os animais tratados apenas com veículo apresentaram aumento significativo na expressão destes mediadores. De modo relevante, o tratamento com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R (DALBK, 50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5) preveniu de forma significativa o aumento da expressão do RNAm para o TNF- $\alpha$  (Figura 26A), IFN- $\gamma$  (Figura 26B) e T-bet (Figura 26C) na medula espinhal após 25 dias de indução da EAE. Além disso, o tratamento com o antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R foi capaz de inibir de maneira significativa, apenas a

expressão do fator de transcrição T-bet (Figura 26). Estes dados, analisados em conjunto, sugerem que o bloqueio dos receptores de cininas, especialmente o subtipo B<sub>1</sub>R durante a fase de gênese da EAE, além de inibir a resposta imunológica nos tecidos linfóides periféricos, foi também capaz de inibir a resposta neuroinflamatória, através da modulação das células encefalitogênicas Th17 e Th1.

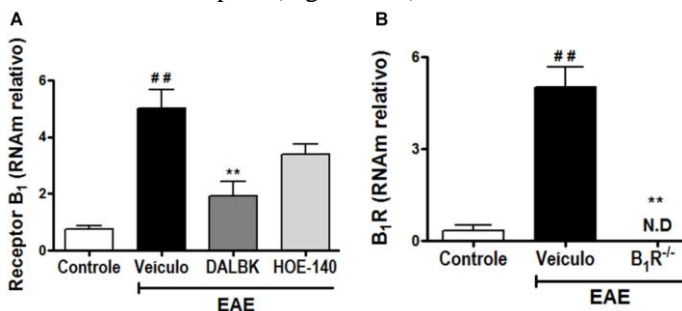


**Figura 26. O pré-tratamento com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R inibiu os linfócitos CD4<sup>+</sup> Th1 no SNC após a indução da EAE.** Os níveis de RNAm para o TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) e T-bet (C) foram avaliados por RT-PCR. O RNAm total foi extraído da medula espinhal de animais do grupo controle, EAE, de animais pré-tratados com DALBK (50 nmol/kg) ou com HOE-140 (150 nmol/kg). O RNAm para GAPDH foi utilizado para normalizar a quantidade relativa de RNAm. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. <sup>##</sup>p<0,001 versus o grupo controle, <sup>\*</sup>p<0,05 e <sup>\*\*</sup>p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

De forma interessante, a indução da EAE induziu o aumento significativo na expressão do B<sub>1</sub>R na medula espinhal após 25 dias de indução (Figura 27A). Por outro lado, os animais tratados previamente



com o antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R (DALBK, 50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5) inibiu significativamente a expressão do próprio receptor B<sub>1</sub> (Figura 27A), enquanto que o tratamento com HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., dia 0-5) não foi capaz de modular a expressão do B<sub>1</sub>R (Figura 27A). Além disso, outro grupo de experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar se os animais nocautes para o B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) poderiam apresentar algum nível de RNAm para o próprio receptor após a indução da EAE. Conforme ilustrado na Figura 27B, após a indução da EAE foi observado aumento relevante no RNAm para o B<sub>1</sub>R no grupo tratado apenas com veículo, enquanto que nos animais com deleção gênica para o B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) o RNAm para o próprio B<sub>1</sub>R não foi detectado. Estes últimos resultados são extremamente relevantes para confirmar que os animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> utilizados neste projeto não expressam o receptor de bradicinina tipo 1 (Figura 27B).

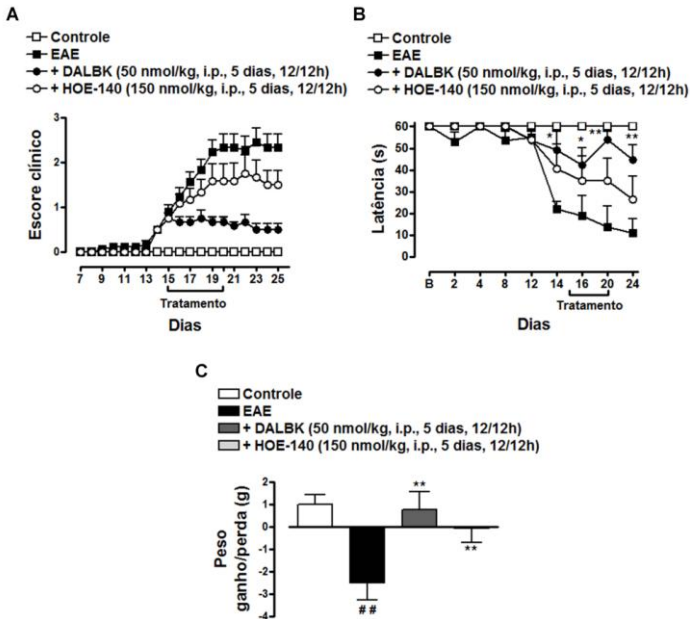


**Figura 27. O bloqueio do B<sub>1</sub>R preveniu o aumento do RNAm para o B<sub>1</sub>R no SNC, após a indução da EAE.** O RNAm total foi extraído da medula espinhal de animais do grupo controle, EAE, de animais pré-tratados com DALBK (50 nmol/kg), de animais pré-tratados com HOE-140 (150 nmol/kg) ou de animais nocautes para o B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>. Os níveis de RNAm para B<sub>1</sub>R (A e B) foi avaliado por RT-PCR. O RNAm para GAPDH foi utilizado para normalizar a quantidade relativa de RNAm. N.D., níveis não detectados de RNAm. Os dados são apresentados como média ± EPM e são representativos de três experimentos independentes. ##p<0,001 versus o grupo controle, \*\*p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newmann-Keuls).

#### 4.6 O bloqueio do B<sub>1</sub>R após o início da doença reduziu os sinais clínicos e a neuroinflamação induzida pela EAE

Tendo em vista que os pacientes com EM necessitam de terapias mais eficazes após o surgimento e/ou desenvolvimento da doença, o próximo objetivo deste trabalho foi investigar se o tratamento terapêutico com o antagonista do B<sub>1</sub>R, DALBK (50 nmol/kg, i.p.), ou com o antagonista do B<sub>2</sub>R, HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) poderiam

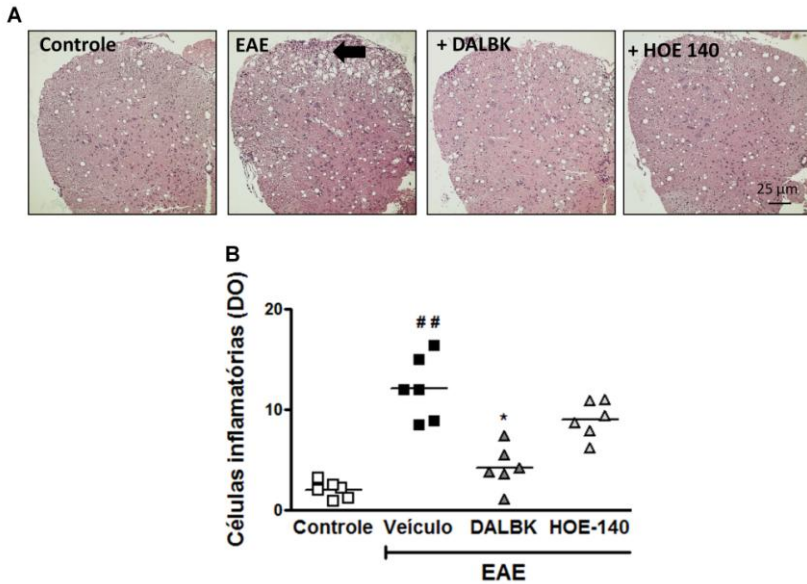
modular os sinais clínicos, assim como a neuroinflamação induzida pela EAE. Desta forma, os animais foram devidamente tratados durante cinco dias, 2x/dia, após o surgimento dos primeiros sinais clínicos da EAE, entre os dias 15 ao dia 20 pós-imunização, caracterizando a fase crônica da EAE. De maneira relevante, o tratamento terapêutico com DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 15-20) inibiu de maneira significativa os sinais clínicos (Figura 28A) e o déficit locomotor (Figura 28B) induzidos pela EAE, quando comparado com o grupo EAE. Além disso, nos animais tratados com DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia) durante a fase crônica da EAE, pode-se observar uma diminuição na perda de peso corporal em relação aos animais do grupo EAE (Figura 28C).



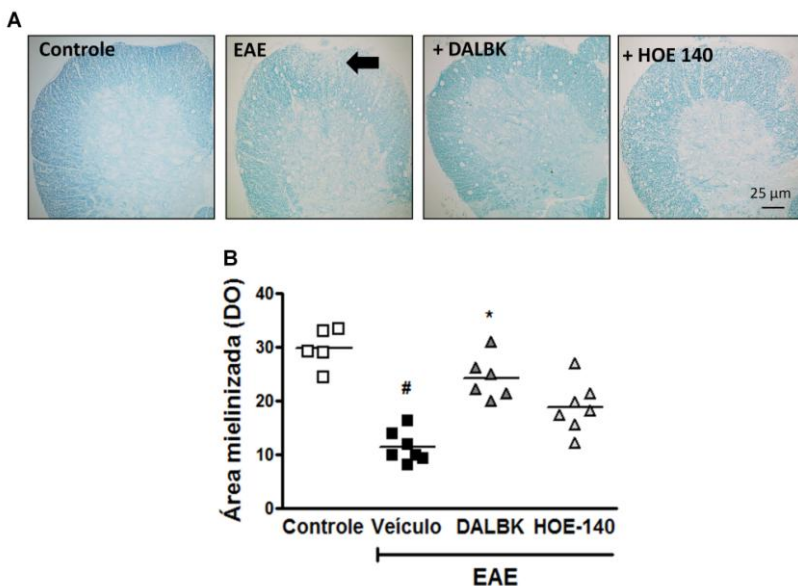
**Figura 28. O tratamento terapêutico com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R reduziu os sinais clínicos induzidos pela EAE.** Escore clínico (A), atividade locomotora (C) e a proporção ganho em relação à perda de peso no pico da doença (19º dia após a imunização) foram analisadas no grupo controle, no grupo com EAE, em animais terapêuticamente tratados com DALBK (50 nmol/kg), ou com HOE-140 (150 nmol/kg). Os dados são apresentados como média ± EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de três experimentos independentes. ##p<0,001 versus o grupo controle, \*p<0,05 e \*\*p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Outro parâmetro avaliado foi à resposta neuroinflamatória induzida pela EAE. Para isso, a medula espinhal dos animais do grupo controle, do grupo com EAE, de animais terapeuticamente tratados com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R - DALBK (50 nmol/kg), ou dos animais tratados terapeuticamente com o antagonista seletivo do B<sub>2</sub>R - HOE-140 (150 nmol/kg) foram obtidas 25 dias após a indução da EAE. Conforme ilustrado nas Figuras 29 e 30, as análises histológicas das medulas espinhais dos animais controles sem EAE não apresentaram infiltrado de células inflamatórias (Figura 29), assim como nenhuma área de desmielinização (Figura 30). Em contrapartida, após a indução da EAE, os animais apresentaram foco inflamatório na medula espinhal (Figura 29) e desmielinização da substância branca da medula espinhal (Figura 30). De forma significativa, o tratamento dos animais com a DALBK (50 nmol/kg, i.p., 20x/dia) durante a fase crônica da EAE (dia 15 – dia 20) reduziu, de maneira significativa, o infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares na medula espinhal (Figura 29A e B), assim como preveniu a desmielinização na substância branca da medula espinhal quando comparado com os animais do grupo EAE (Figura 30A e B). Por outro lado, o tratamento terapêutico com o HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 15-20), não inibiu, de maneira significativa, a progressão da EAE, assim como o número de células inflamatórias e a desmielinização na medula espinhal após 25 dias de imunização.

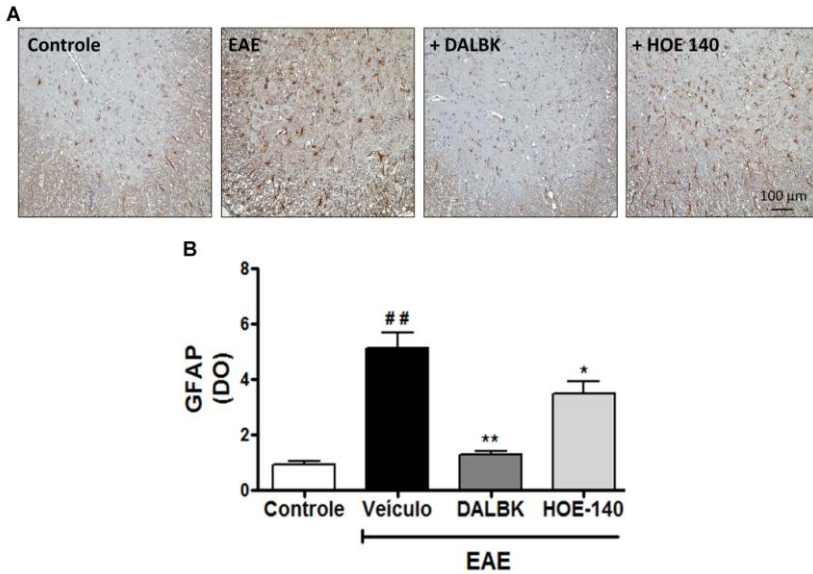
Além disso, a indução da EAE induziu de maneira significativa a ativação de células gliais como, por exemplo, astrócitos (Figura 31) e microglia (Figura 32) na medula espinhal 25 dias após a imunização. De modo relevante, o tratamento com a DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0 – 5) durante a fase crônica da EAE preveniu significativamente a ativação dos astrócitos (Figura 31A e B) e da microglia (Figura 32A e B) na medula espinhal, 25 dias após a indução da EAE. Além disso, as porcentagens de inibição observadas quanto à expressão do GFAP e do Iba-1, na medula espinhal foram de 81 e 74%, respectivamente (Figuras 31 e 32). Ainda, foi possível observar que o tratamento com o HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 15-20) inibiu de maneira significativa a expressão de GFAP (Figura 31A e B) e Iba-1 (Figura 32A e B) na substância branca da medula espinhal após 25 dias de imunização, com inibições de 34 e 84%, respectivamente.



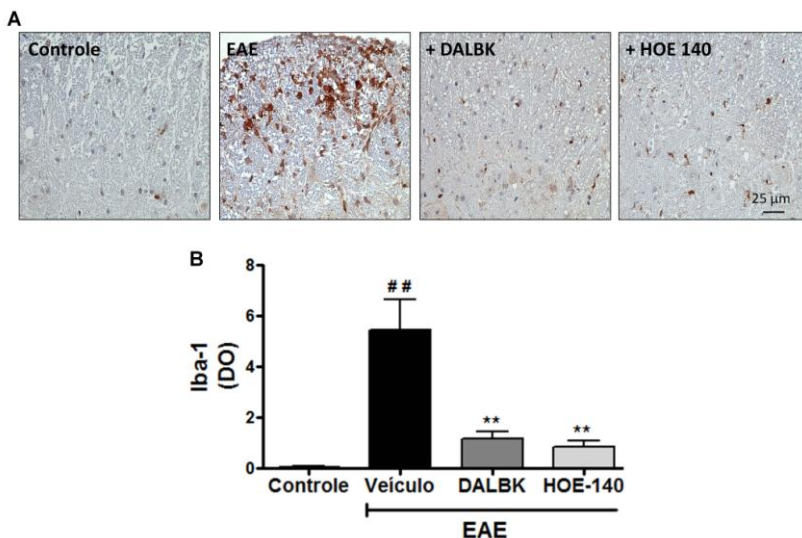
**Figura 29. O bloqueio do B<sub>1</sub>R após o surgimento dos sintomas da EAE inibiu o número de células inflamatórias no SNC.** (A e B) O número de células inflamatórias foi analisado no grupo controle, no grupo EAE, em animais tratados com DALBK (50 nmol/kg), ou com HOE-140 (150 nmol/kg). Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 15-20). (B) A quantificação foi baseada em uma média de quatro campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 6-9 animais/grupo. Barra de escala corresponde a 25 µm. Detalhe: foco inflamatório presente no grupo EAE. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média ± EPM e são representativos de três experimentos independentes. ##*p*<0,001 versus o grupo controle, \**p*<0,05 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).



**Figura 30. O bloqueio do  $B_1R$  durante a fase crônica da EAE preveniu a desmielinização no SNC, após a indução da EAE.** (A e B) A área mielinizada foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, em animais tratados com DALBK (50 nmol/kg), ou com HOE-140 (150 nmol/kg). Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 15-20). (B) A quantificação foi baseada em uma média de quatro campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 6-9 animais/grupo. Barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m. Detalhe: marcação da área de desmielinização significativa no grupo EAE. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. ## $p < 0,001$  versus o grupo controle, \* $p < 0,05$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).



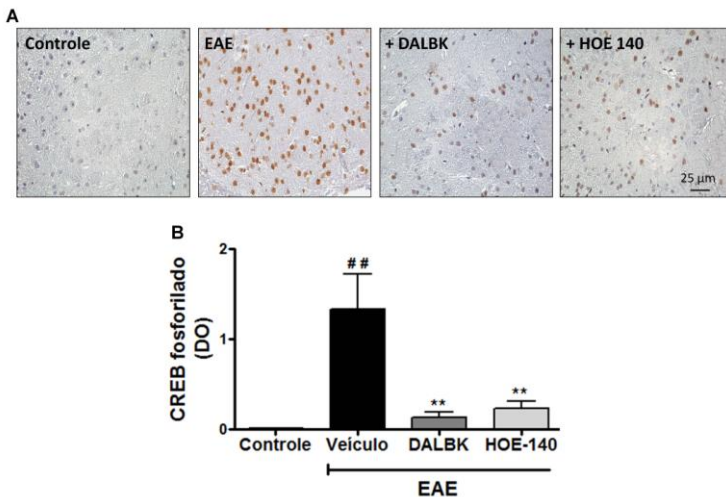
**Figura 31. O bloqueio do B<sub>1</sub>R durante a fase crônica da EAE inibiu a ativação de astrócitos no SNC.** (A) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinhal. (B) A expressão de GFAP foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, em animais tratados com DALBK (50 nmol/kg), ou com HOE-140 (150 nmol/kg). Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 15-20). (B) A quantificação foi baseada em uma média de quatro campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 6-9 animais/grupo. Barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. ## $p$ <0,001 versus o grupo controle, \* $p$ <0,05 e \*\* $p$ <0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).



**Figura 32. O bloqueio do B<sub>1</sub>R durante a fase crônica da EAE inibiu a ativação microglial no SNC.** (A) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinal. (B) A expressão de Iba-1 foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, em animais tratados com DALBK (50 nmol/kg), ou com HOE-140 (150 nmol/kg). Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 15-20). (B) A quantificação foi baseada em uma média de quatro campos oculares da substância branca da medula espinal de um total de 6-9 animais/grupo. Barra de escala corresponde a 25 µm. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média ± EPM e são representativos de três experimentos independentes. ##p<0,001 versus o grupo controle, \*\*p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

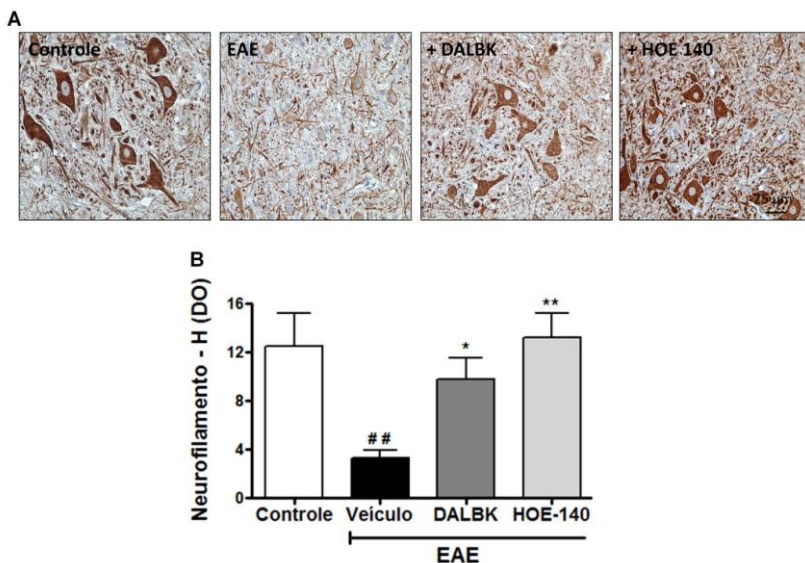
Ainda, a fosforilação do CREB na substância branca da medula espinal foi 12 vezes maior em animais com EAE, do que nos animais controle. De maneira relevante, o tratamento terapêutico com a DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 15-20) (Figura 33A e B), ou com o HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 15-20) (Figura 33A e B), bloqueou de forma significativa a fosforilação do CREB na substância branca da medula espinal 25 dias pós-imunização. A seguir foi avaliado se o bloqueio dos receptores de cininas, durante a fase crônica da EAE, poderia controlar a perda axonal induzida pela imunização dos animais com MOG<sub>35-55</sub>. Para isso, o nível de expressão do neurofilamento-H, uma marcador de integridade do citoesqueleto neuronal (Trapp *et al.*, 1998), foi avaliado na medula espinal dos animais, 25 dias após a imunização. Na Figura 34 estão demonstradas as fotos representativas

da imunomarcção para o NF-H nos neurônios presentes na substância cinzenta da medula espinhal. Como esperado, a indução da EAE resultou em diminuição significativa da expressão do NF-H na medula espinhal, demonstrando perda axonal relevante nos animais do grupo EAE (Figura 34A e B). De modo interessante, o tratamento terapêutico com DALBK (50 nmol/kg, i.p.) e HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.), durante a fase crônica da EAE, reduziu significativamente a perda axonal induzida pela EAE (Figura 34A e B). Em conjunto estes dados sugerem que o bloqueio dos receptores de cininas, especialmente o B<sub>1</sub>R, no SNC inibiu a progressão da EAE, principalmente por afetar a ativação/função das células gliais como, por exemplo, astrócitos e microglia, as quais em conjunto poderiam induzir a neuroinflamação.



**Figura 33. O bloqueio do B<sub>1</sub>R durante a fase crônica da EAE bloqueou a fosforilação do CREB no SNC.** (A) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinhal. (B) A expressão de CREB fosforilado foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, em animais tratados com DALBK (50 nmol/kg), ou com HOE-140 (150 nmol/kg). Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 15-20). (B) A quantificação foi baseada em uma média de quatro campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 6-9 animais/grupo. Barra de escala corresponde a 25 μm. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média ± EPM e são representativos de três experimentos independentes. ##p<0,001 versus o grupo controle, \*\*p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

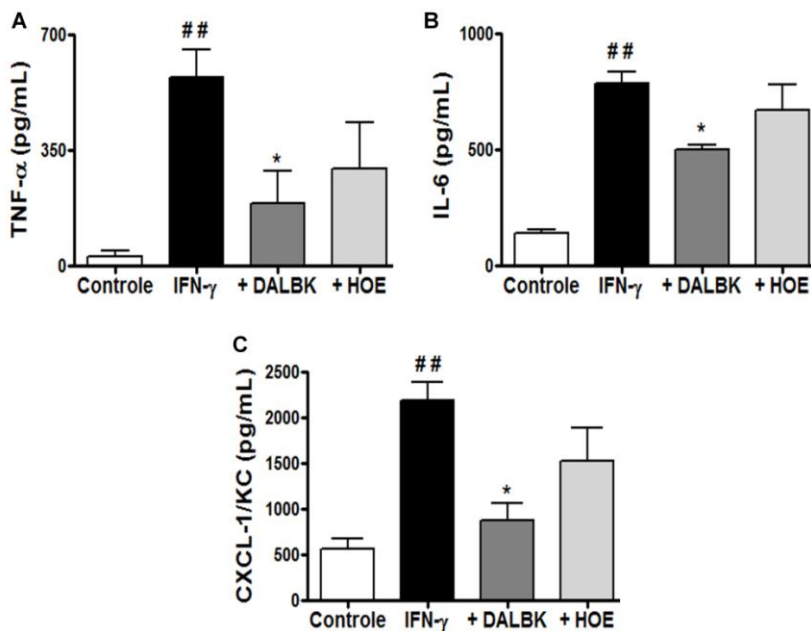




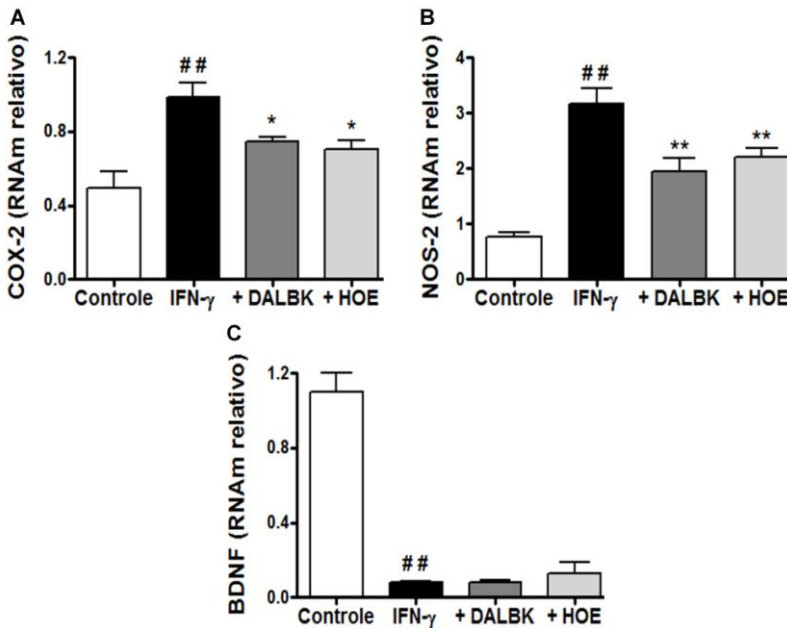
**Figura 34. O tratamento terapêutico com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R e do B<sub>2</sub>R restaurou a expressão do NF-H no SNC.** (A) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinhal. (B) A expressão de NF-H foi analisada no grupo controle, no grupo EAE, em animais tratados com DALBK (50 nmol/kg), ou com HOE-140 (150 nmol/kg). Os antagonistas foram administrados por via i.p., duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 15-20). (B) A quantificação foi baseada em uma média de quatro campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 6-9 animais/grupo. Barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. ## $p$ <0,001 versus o grupo controle, \*\* $p$ <0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

#### 4.7 Antagonistas dos B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R bloqueiam a liberação e a expressão de mediadores pró-inflamatórios pelos astrócitos

A fim de investigar o possível mecanismo pelos quais os receptores de cininas modulam a neuroinflamação durante a fase crônica da EAE, o próximo objetivo deste trabalho foi avaliar se o bloqueio dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de bradicinina poderiam diminuir a expressão/produção de mediadores pró-inflamatórios em cultura primária de astrócitos. Estas células foram isoladas do córtex de animais C57BL/6 neonatos (1-3 dias) e tratadas com diferentes drogas, conforme descrito na seção material e métodos. De acordo com as Figuras 35 e 36, níveis reduzidos de TNF- $\alpha$  (Figura 35A), IL-6 (Figura 35B) e CXCL1/KC (Figura 35C), assim como RNAm para COX-2 (Figura 36A) e NOS-2 (Figura 36B) foram detectados no grupo controle. No entanto, a estimulação *in vitro* dos astrócitos com IFN- $\gamma$  (50 U/mL) por 48 horas aumentou, de maneira significativa, a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e CXCL1/KC, assim como a expressão da COX-2 e NOS-2 (Figura 35 e 36). Para verificar o envolvimento dos receptores de cininas na ativação destas células, os astrócitos foram incubados com o antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R (DALBK, 5  $\mu$ M), ou com o antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R (HOE-140, 5  $\mu$ M). Os resultados das Figuras 35 e 36 demonstram que o tratamento *in vitro* com DALBK (5  $\mu$ M) inibiu de maneira significativa a produção de TNF- $\alpha$  (Figura 35A), IL-6 (Figura 35B) e CXCL1/KC (Figura 35C), assim como a expressão de COX-2 (Figura 36A) e NOS-2 (Figura 36B), em astrócitos estimulados com IFN- $\gamma$  (50 U/mL). De maneira interessante, o antagonista do B<sub>1</sub>R não foi capaz de modular o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Figura 36C). Além disso, o tratamento com HOE-140 (5  $\mu$ M) inibiu apenas o RNAm da COX-2 e da NOS-2 (Figuras 35 e 36), o que poderia explicar o efeito parcial do B<sub>2</sub>R em modular a progressão da EAE durante a fase crônica.



**Figura 35. Efeito da adição dos antagonistas seletivos para o B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R sobre a produção de citocinas/quimiocinas induzida por IFN- $\gamma$  em cultura primária de astrocitos.** Os astrocitos foram coletados, cultivados e estimulados *in vitro* com IFN- $\gamma$  (50 U/mL) por 48 horas, na presença ou ausência do antagonista do B<sub>1</sub>R (DALBK, 5  $\mu$ M) ou do B<sub>2</sub>R (HOE-140, 5  $\mu$ M). Os antagonistas foram adicionados 18 h previamente e juntamente com o IFN- $\gamma$ . Após 48 h, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e CXCL1/KC (C) determinados por ELISA. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. <sup>##</sup>p<0,001 versus o grupo não tratado, \*p<0,05 versus o grupo tratado com IFN- $\gamma$  (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).



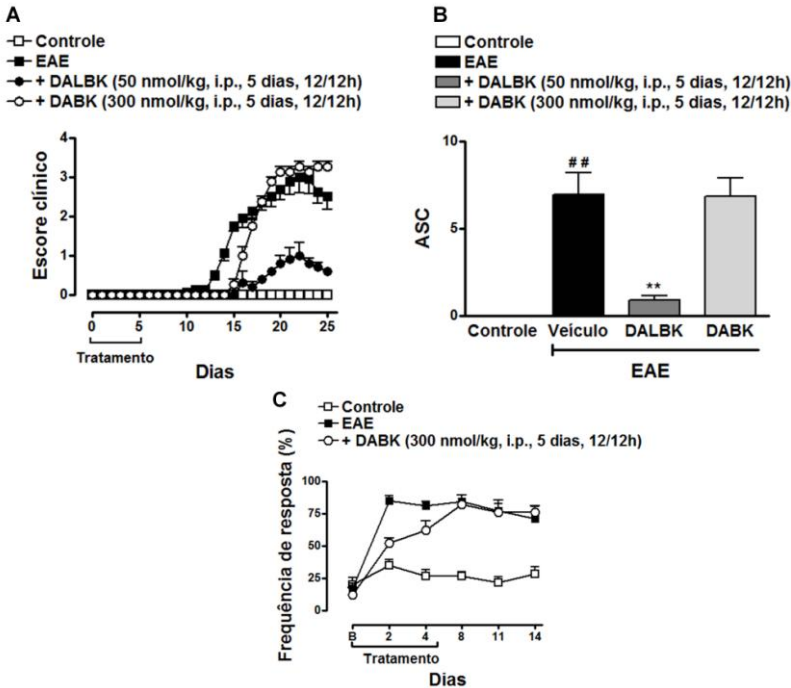
**Figura 36. Efeito da adição dos antagonistas seletivos para o B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R sobre a expressão de mediadores pró-inflamatórios em cultura primária de astrócitos.** Os astrócitos foram coletados, cultivados e estimulados *in vitro* com IFN- $\gamma$  (50 U/mL) por 48 h, na presença ou ausência do antagonista do B<sub>1</sub>R (DALBK, 5  $\mu$ M) ou do B<sub>2</sub>R (HOE-140, 5  $\mu$ M). Os antagonistas foram adicionados 18 h previamente e juntamente com o IFN- $\gamma$ . Após 48 h, os níveis de RNAm para a COX-2 (A), NOS-2 (B) e BDNF (C) foram avaliados por RT-PCR. O RNAm para GAPDH foi utilizado para normalizar a quantidade relativa de RNAm. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e são representativos de três experimentos independentes. <sup>##</sup>p<0,001 versus o grupo não tratado, <sup>\*</sup>p<0,05 e <sup>\*\*</sup>p<0,001 versus o grupo tratado com IFN- $\gamma$  (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

#### 4.8 A ativação do B<sub>1</sub>R durante a fase aguda da EAE inibiu os sinais clínicos e a neuroinflamação no SNC: efeito *dual* do receptor B<sub>1</sub> de bradicinina na EAE

Os dados gerados até o presente momento deste trabalho, juntamente com os trabalhos previamente publicados, sugerem que o bloqueio dos receptores de cininas, especialmente o subtipo B<sub>1</sub>R, inibe de forma significativa a gênese e progressão da EAE (Prat *et al.*, 2005;

Dos Santos *et al.*, 2008; Gobel *et al.*, 2011). No entanto, um inesperado estudo demonstrou que o tratamento de animais selvagens com o agonista seletivo do B<sub>1</sub>R inibe a progressão da EAE, sugerindo que a ativação do receptor B<sub>1</sub> de bradicinina restringe a migração de linfócitos Th1 e Th17 auto-agressivos para o SNC (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009). A fim de tentarmos esclarecer estas discrepâncias, a última etapa deste projeto avaliou se a administração do agonista seletivo para o B<sub>1</sub>R poderia exercer alguma ação protetora nas diferentes fases da EAE. Inicialmente, os animais foram devidamente tratados com o agonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (DABK, 300 nmol/kg) durante a fase de indução da doença, ou seja, entre os dias 0 e dia 5. O agonista foi administrado por via i.p. com duas injeções diárias (12/12 horas), sendo que os animais foram avaliados até 25º dia pós-imunização.

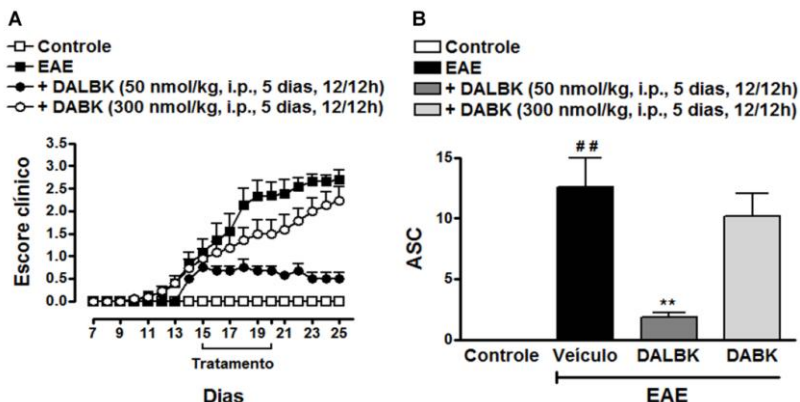
Os resultados da Figura 37 demonstraram que a ativação do B<sub>1</sub>R durante a fase de indução da EAE não inibiu, de maneira significativa, o desenvolvimento da doença. Os animais tratados com DABK apresentaram paralisia crescente a partir do 15º dia após a imunização (dia do surgimento dos sintomas:  $15 \pm 0,5$ ), atingindo o escore clínico máximo a partir do 20º dia (escore máximo:  $3,5 \pm 0,2$ ), o qual se manteve até o último dia de análise. De maneira interessante, os animais tratados com DABK não apresentaram diferença estatística nos sinais clínicos quando comparado com os animais do grupo EAE (Figura 37A e B). Por outro lado, o tratamento com o antagonista do B<sub>1</sub>R, a DALBK, foi capaz de bloquear significativamente os sinais clínicos induzidos pela EAE (Figura 37A e B). Além disso, a Figura 37C ilustra que os animais tratados com o agonista DABK (300 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 0-5) apresentaram aumento na hiperalgesia mecânica induzida pela EAE, de maneira similar aos animais do grupo EAE.



**Figura 37. A ativação do B<sub>1</sub>R durante a fase de indução da EAE não bloqueou a gênese da EAE.** Animais foram imunizados com um mistura do peptídeo MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *Pertussis*. Escore clínico (A), área sob a curva (ASC) (B) e hiperalgesia mecânica (C) foram analisados no grupo controle sem EAE, no grupo com EAE, em animais previamente tratados com o agonista seletivo do B<sub>1</sub>R - DABK (300 nmol/kg) ou em animais pré-tratados com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R - DALBK (50 nmol/kg) por um período de 25 dias pós-imunização. Agonista/antagonista foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 0-5). Os dados são apresentados como média ± EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de dois experimentos independentes. ##p<0,001 versus o grupo controle, \*\*p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Em seguida, o próximo objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento com a DABK durante a fase crônica da EAE poderia reduzir a progressão da doença. Como ilustrado na Figura 38, o tratamento terapêutico com o agonista DABK (300 nmol/kg, i.p.) durante a fase crônica da EAE (dia 15-20) não inibiu, de maneira significativa, a

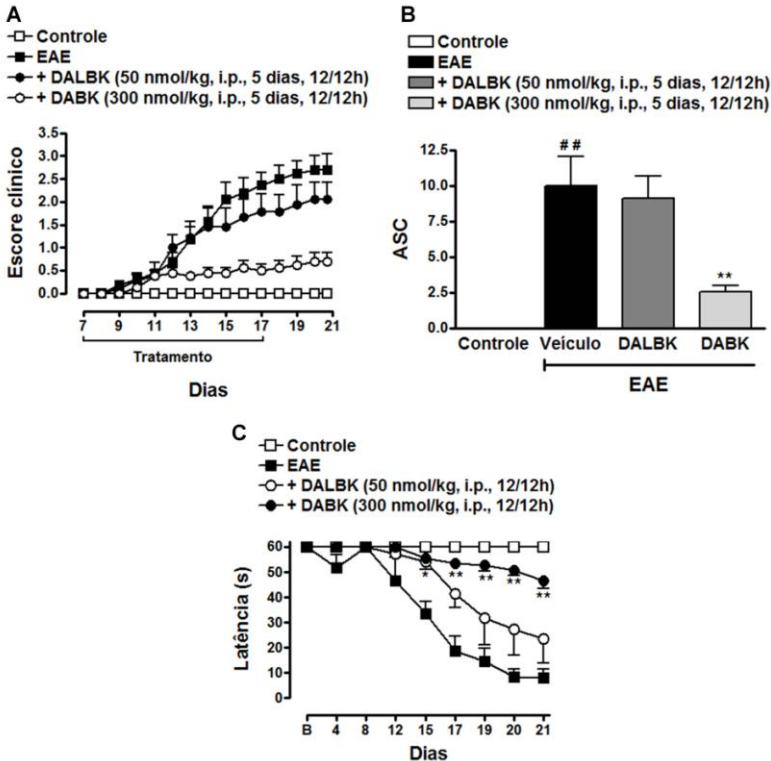
progressão da EAE, quando comparado com o antagonista DALBK (50 nmol/kg, i.p.) (Figura 38A e B).



**Figura 38. A ativação do B<sub>1</sub>R durante a fase crônica da EAE não inibiu a progressão da doença.** Animais foram imunizados com o peptídeo MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *Pertussis*. Escore clínico (A) e área sob a curva (ASC) (B) foram analisados no grupo controle sem EAE, no grupo com EAE, em animais terapêuticamente tratados com o agonista seletivo do B<sub>1</sub>R - DABK (300 nmol/kg) ou em animais tratados com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R - DALBK (50 nmol/kg) por um período de 25 dias pós-imunização. Agonista/antagonista foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), duas vezes ao dia (12/12 h), durante cinco dias (dia 15-20). Os dados são apresentados como média ± EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de dois experimentos independentes. <sup>##</sup>p<0,001 versus o grupo controle, <sup>\*\*</sup>p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

No entanto, para avaliar a ação do agonista e do antagonista para o B<sub>1</sub>R sobre o desenvolvimento da EAE, os animais foram devidamente tratados com DABK (300 nmol/kg, i.p., 2x/dia) e DALBK (50 nmol/kg, i.p., 2x/dia), durante a fase aguda da EAE entre os dias 7 ao dia 17 pós-imunização. De forma surpreendente, o tratamento dos animais com o agonista do B<sub>1</sub>R, DABK, inibiu de maneira significativa o escore clínico (Figura 39A), assim como a déficit locomotor (Figura 39C) induzido pela EAE. A análise da área sob a curva (ASC) obtida entre os dias 7-21 pós-imunização demonstrou uma inibição de 75% (Figura 39B), quando comparado com os animais do grupo EAE. Ao contrário, durante a fase aguda da doença, o tratamento dos animais com

o antagonista do B<sub>1</sub>R, DALBK (50 nmol/kg, i.p.) não foi capaz de inibir o desenvolvimento da EAE (Figura 39).

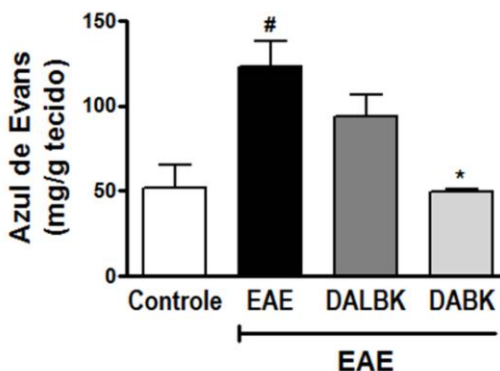


**Figura 39. A ativação do B<sub>1</sub>R durante a fase aguda da EAE bloqueou o desenvolvimento da EAE.** Animais foram imunizados com o peptídeo MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *Pertussis*. Escore clínico (A), área sob a curva (ASC) (B) e atividade locomotora (C) foram analisados no grupo controle sem EAE, no grupo com EAE, em animais terapêuticamente tratados com o agonista seletivo do B<sub>1</sub>R - DABK (300 nmol/kg) ou em animais tratados com o antagonista seletivo do B<sub>1</sub>R - DALBK (50 nmol/kg) por um período de 21 dias pós-imunização. Agonista/antagonista foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), duas vezes ao dia (12/12 h), durante os dias 7-17 pós-imunização. Os dados são apresentados como média ± EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de três experimentos independentes. <sup>##</sup>p<0,001 versus o grupo controle, \*p<0,05 e <sup>\*\*</sup>p<0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Dados da literatura sugerem que uma etapa fundamental para o desenvolvimento da EAE e, conseqüentemente, o surgimento da



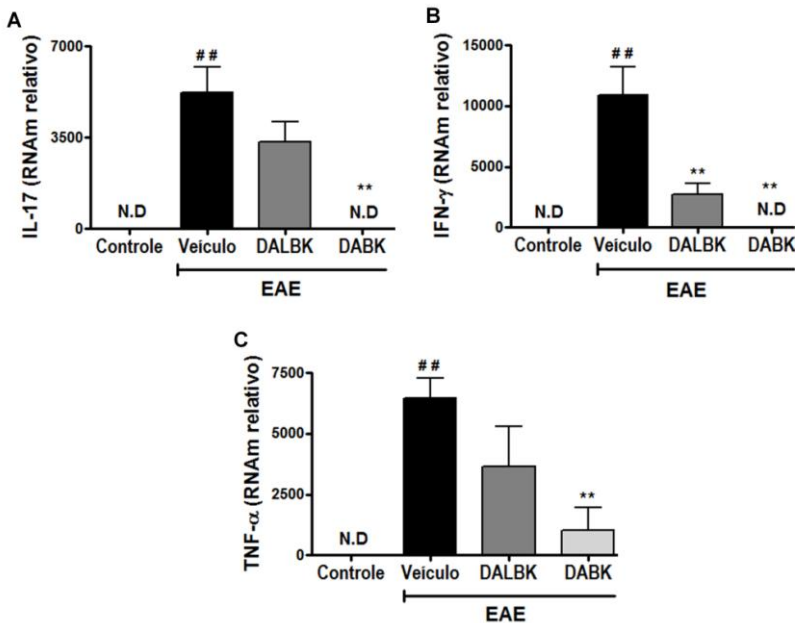
resposta inflamatória no SNC é a ruptura da BHE (Alvarez *et al.*, 2011). Por esta razão, o próximo objetivo deste estudo foi investigar se a ativação do B<sub>1</sub>R durante a fase aguda da EAE poderia alterar a permeabilidade da BHE, e conseqüentemente a neuroinflamação induzida por linfócitos Th17 e Th1 encefalitogênicos. Para isso foram utilizados o teste do azul de Evans e a expressão de citocinas Th17 e Th1 na medula espinhal dos animais, respectivamente. Conforme a Figura 40, no dia 21 após a imunização, os animais do grupo EAE apresentaram aumento significativo no extravasamento do azul de Evans na medula espinhal, demonstrando assim, aumento na permeabilidade da BHE (Figura 40). De maneira interessante, o tratamento dos animais com o agonista DABK (300 nmol/kg, i.p.), durante a fase aguda da EAE reduziu, de forma significativa, a permeabilidade da BHE, enquanto que o antagonista DALBK (50 nmol/kg, i.p.) induziu aumento no extravasamento do azul de Evans, de forma similar aos animais do grupo EAE (Figura 40).



**Figura 40. O tratamento com o agonista DABK modulou a permeabilidade da BHE após a indução da EAE.** Medula espinhal foi coletada do grupo controle, EAE, DABK (300 nmol/kg) ou DALBK (50 nmol/kg) após 21 dias. Agonista/antagonista foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), duas vezes ao dia (12/12 h), durante os dias 7-17 pós-imunização. A permeabilidade da BHE foi avaliada através do extravasamento do corante azul de Evans. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de três experimentos independentes. <sup>##</sup> $p < 0,001$  versus o grupo controle,  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,001$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Por fim, o tratamento dos animais com a DABK (300 nmol/kg, i.p., 2x/dia, dia 7-17) reduziu, de forma significativa, a expressão de IL-

17 (Figura 41A), IFN- $\gamma$  (Figura 41B) e TNF- $\alpha$  (Figura 41C) no SNC, com porcentagem de inibição de 100, 100 e 94%, respectivamente. Já o tratamento com o antagonista DALBK (50 nmol/kg, i.p., dia 7-17), durante a fase aguda da EAE, não foi capaz de reduzir a expressão desses mediadores (Figura 41). Estes resultados sugerem que, na fase aguda da EAE, o agonista do B<sub>1</sub>R inibe a ruptura da BHE, impedindo assim a entrada de linfócitos Th17 e Th1 auto-reativos no SNC e conseqüentemente suprime a neuroinflamação.



**Figura 41. O tratamento com o agonista DABK durante a fase aguda da EAE inibiu a ativação de linfócitos Th17 e Th1 no SNC.** Medula espinhal foi coletada do grupo controle, EAE, DABK (300 nmol/kg) ou DALBK (50 nmol/kg) após 21 dias da imunização. Agonista/antagonista foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), duas vezes ao dia (12/12 h), durante os dias 7-17 pós-imunização. Após 21 dias, os níveis de RNAm para IL-17 (A), IFN- $\gamma$  (B) e TNF- $\alpha$  (C) foram avaliados por RT-PCR. O RNAm para GAPDH foi utilizado para normalizar a quantidade relativa de RNAm. N.D.: nível de RNAm não detectado. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6-9 animais/grupo e são representativos de três experimentos. ## $p$ <0,001 versus o grupo controle, \* $p$ <0,05 e \*\* $p$ <0,001 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente a compreensão dos mecanismos que levam à incapacidade neurológica em pacientes portadores da EM associado com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas destinadas a reduzir a progressão da doença tem se destacado nas pesquisas com EM. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar a participação das cininas, assim como dos seus respectivos receptores,  $B_1R$  e  $B_2R$ , na modulação da encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo clássico de EM. Nossos resultados demonstraram que o bloqueio dos receptores das cininas, especialmente o subtipo  $B_1R$  durante a fase de indução e/ou crônica da EAE, impediu a progressão da doença por inibir o início da resposta imunológica nos órgãos linfóides periféricos como, por exemplo, linfonodos e baço, assim como inibiu a neuroinflamação através da modulação das células gliais incluindo os astrócitos/microglia. Por outro lado, a administração sistêmica do agonista seletivo do  $B_1R$ , mas não do antagonista deste mesmo receptor, durante a fase aguda da EAE também foi eficaz em reduzir de maneira significativa a severidade da doença, assim como preveniu o aumento da permeabilidade da BHE e, conseqüentemente a neuroinflamação. Além disso, os resultados aqui apresentados demonstraram que o  $B_2R$  também apresenta efeito parcial em modular a severidade da EAE. Esse conjunto de resultados nos permite sugerir que o receptor  $B_1$  das cininas apresenta um papel particular em modular a progressão da EAE, já que dependendo da fase de tratamento tanto o agonista seletivo para o  $B_1R$ , a DABK, quanto o antagonista seletivo para o  $B_1R$ , a DALBK, foram capazes de bloquear a progressão da doença atuando de diferentes mecanismos.

Está bem estabelecido na literatura que os receptores  $B_1$  e  $B_2$  para as cininas, assim como as vias de segundos mensageiros associados à sua estimulação, exercem um papel fundamental no controle da inflamação, assim como na transmissão nociceptiva (Calixto *et al.*, 2004). De fato, trabalhos recentes sugerem que o bloqueio de ambos os receptores para as cininas resulta em bloqueio da nocicepção, influxo de células inflamatórias, a expressão/produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e a ativação do fator de transcrição nuclear, como o NF- $\kappa$ B (Calixto *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006; Dos Santos *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2008; Hara *et al.*, 2008; Prediger *et al.*, 2008). Por outro lado, a ativação dos receptores  $B_1R$  e  $B_2R$  para as cininas está associada com o surgimento de hiperalgesia mecânica (Ferreira *et al.*, 2008), atração de leucócitos para o local da inflamação (Dornelles *et al.*,

2009), estresse oxidativo (Dias *et al.*, 2010), aumento da expressão de metaloproteinase-2 e -9 (Ehrenfeld *et al.*, 2011), assim como pelo aumento da permeabilidade vascular em diferentes condições patológicas, incluindo as doenças auto-imunes, tais como colite ulcerativa (Hara *et al.*, 2008), artrite reumatóide (Cassim *et al.*, 2009), e mais recentemente, também a esclerose múltipla (Prat *et al.*, 2005; Dos Santos *et al.*, 2008; Schulze-Topphoff *et al.*, 2009; Gobel *et al.*, 2011).

Os dados existentes na literatura com relação à participação das cininas na modulação da EM, anterior ao início deste projeto, eram escassos, ou seja, existiam apenas alguns indicativos sugerindo a participação do sistema caliceína-cinina na EM. Assim, níveis aumentados de BK, des-Arg<sup>9</sup>-BK (DABK, agonista do B<sub>1</sub>R), caliceínas-1, caliceínas-6, assim como cininogênios de alto e baixo peso molecular foram encontrados em tecidos cerebrais de animais com EAE, assim como em pacientes com EM (Germain *et al.*, 1988). Prat *et al.* (2000) demonstraram que a administração de IFN- $\gamma$  em culturas de células endoteliais de cérebro humano aumentou a expressão dos receptores B<sub>1</sub>, e de forma significativa o R-838, agonista seletivo do B<sub>1</sub>R, induziu aumento da permeabilidade da BHE (Prat *et al.*, 2000). Além disso, Prat e colaboradores (2005) foram os primeiros a demonstrar o aumento da expressão do RNAm do B<sub>1</sub>R em células mononucleares derivadas do sangue periférico, provenientes de pacientes com EM, e mais ainda, que, esta expressão foi correlacionada com o surgimento de surtos nestes pacientes (Prat *et al.*, 2005).

No entanto, trabalhos mais recentes sugerem a participação de ambos os receptores da bradicinina na modulação da EAE, no entanto, os resultados são ainda controversos e conflitantes, principalmente em relação ao papel do receptor B<sub>1</sub> (Dos Santos *et al.*, 2008; Schulze-Topphoff *et al.*, 2009; Gobel *et al.*, 2011).

No estudo realizado por Dos Santos e colaboradores, os autores demonstraram que a ausência do B<sub>2</sub>R (utilizando camundongos nocautes: B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) modulou a expressão das quimiocinas CCL2/CCL5, e alterou o recrutamento de leucócitos para o SNC, assim como os sinais clínicos induzidos pela EAE (Dos Santos *et al.*, 2008), entretanto a participação do B<sub>1</sub>R não foi avaliada neste estudo. Os resultados do presente estudo demonstraram que o bloqueio do B<sub>2</sub>R durante a fase de indução da EAE, através do tratamento farmacológico com o antagonista seletivo, o HOE-140, ou pela utilização de animais com deleção gênica (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>), reduziu parcialmente o desenvolvimento da EAE, assim como a dor neuropática induzida pela EAE, confirmando os

dados previamente publicados (Dos Santos *et al.*, 2008). Além disso, o bloqueio do B<sub>2</sub>R inibiu a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e, particularmente, T CD8<sup>+</sup> reativos à MOG nos órgãos linfóides periféricos, tais como linfonodos e baço, diminuiu a fosforilação do fator de transcrição CREB na medula espinhal e também preveniu a perda axonal após 25 dias de indução da doença. Estes resultados analisados em conjunto estendem os dados previamente publicados, os quais demonstraram que os animais nocautes B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> apresentavam redução nos parâmetros clínicos da EAE induzida por MOG através da modulação do recrutamento de leucócitos para o SNC (Dos Santos *et al.*, 2008). No entanto, a inibição do B<sub>2</sub>R não foi capaz de reduzir significativamente o tamanho da área de desmielinização e a infiltração de células inflamatórias no SNC, o que poderia justificar o seu efeito parcial em inibir o desenvolvimento da EAE. Posteriormente outros estudos demonstraram que o B<sub>1</sub>R apresenta um papel dominante em modular a EAE quando comparado com o B<sub>2</sub>R (Gobel *et al.*, 2011).

Entretanto, estudo publicado recentemente demonstrou exatamente o contrário, ou seja, que os animais nocautes para o receptor B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) apresentavam exacerbação da EAE quando comparado com os animais selvagens. Além disso, neste mesmo estudo publicado por Schulze-Topphoff, os autores demonstraram que o tratamento dos animais com o agonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> inibiu a progressão da EAE, sugerindo portanto, que a ativação dos receptores B<sub>1</sub> restringe a migração de linfócitos Th1 e Th17 auto-agressivos para o SNC (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009). Ao contrário dos resultados descritos por Schulze-Topphoff, um trabalho publicado mais recentemente demonstrou exatamente o oposto, ou seja, que o bloqueio dos receptores B<sub>1</sub> é capaz de inibir os sinais clínicos induzidos pela EAE, através da modulação da permeabilidade da BHE (Gobel *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos em nosso estudo confirmam e estendemos resultados descritos por Gobel et al. (2011) e sugerem que o bloqueio do B<sub>1</sub>R, desde a fase de indução da doença, através da utilização de animais com deleção gênica para o B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) impede o aparecimento dos sinais clínicos característicos da EAE, enquanto que os camundongos B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> apresentaram apenas melhora discreta destes sintomas. Como já referido, estes dados são completamente opostos àqueles previamente publicados por Schulze-Topphoff e colaboradores (2009), os quais demonstraram que os animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> apresentam exacerbação da EAE quando comparado com os animais selvagens (*wild-type* - WT) (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009). Esta discrepância entre os animais

nocautes  $B_1R^{-/-}$  poderia ser explicada por diferenças genéticas e formas distintas de manutenção dos animais mutantes, assim como fatores ambientais relacionados com o fenótipo. No trabalho de Schulze-Toppoff *et al.* (2009) foram utilizados animais  $B_1R^{-/-}$ , após 10 retrocruzamentos com camundongos da linhagem C57BL/6 selvagem (geração  $F_{10}$ ), com o objetivo de eliminar o *background* genético da linhagem Sv129, utilizada como matriz original. Em nosso estudo, os animais foram gerados da mesma maneira, porém após os 10 retrocruzamentos com a linhagem C57BL/6 selvagem, os animais mutantes  $B_1R^{-/-}$  foram considerados congênicos e mantidos através de cruzamentos entre si, ou seja, cruzamentos entre irmãos. Entretanto, uma ressalva necessária com este modelo de cruzamento é que com o passar do tempo, o isolamento e a constante geração de animais mutantes homocigotos aumenta-se o risco de surgirem novas mutações, diferentemente da mutação de interesse, as quais poderiam explicar pelo menos parte das diferenças fenotípicas observadas entre os animais congênicos com os animais parentais ou mesmo com os mutantes  $F_{10}$ , caracterizando desta forma o surgimento de uma sublinhagem inata (*inbred*) (Gerlai, 2001; Crusio *et al.*, 2009; Kiselycznyk e Holmes, 2011). De acordo com os nossos dados, outros trabalhos observaram diferenças fenotípicas entre sub-linhagem *inbred* em modelos de depressão, ansiedade e hiperalgesia (Bryant *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se que diversos fatores ambientais como, por exemplo, temperatura, luminosidade, estresse, ruídos, odores, número de animais nas caixas, diferentes experimentadores e ambientes laboratoriais entre outros, podem justificar o aparecimento de diferenças fenotípicas entre sublinhagens similares (Carola e Gross, 2010; Gresack *et al.*, 2010). Neste mesmo contexto, trabalhos recentes sugerem que a microbiota intestinal pode determinar em grande parte a susceptibilidade de animais geneticamente idênticos à EAE (Yokote *et al.*, 2008).

Por esta razão é plausível sugerir que as diferenças fenotípicas observadas entre os nossos animais  $B_1R^{-/-}$  e os animais previamente utilizados por Schulze-Toppoff (2009) poderiam ser explicadas pelo surgimento de novas mutações nos animais  $B_1R^{-/-}$ , assim como por diversos fatores ambientais como, por exemplo, diferentes formas de manter a linhagem *inbred*, umidade/luminosidade, estresse, temperatura, entre outras, as quais não podem ser controladas em estudos diferentes. Além disso, os diversos efeitos biológicos apresentados pelo mesmo alvo terapêutico ilustram a complexidade das doenças desmielinizantes, tais como a EM, e que em conjunto poderiam explicar as diferenças

fenotípicas encontradas entre os mesmos animais nocautes  $B_1R^{-/-}$ . No entanto, vale ressaltar que estas observações não comprometem os nossos dados, tampouco o nosso estudo, já que os nossos animais continuam com a deleção gênica para o  $B_1R$ , conforme ilustrado na Figura 27 deste trabalho. Outro ponto relevante a ser considerado é que no nosso estudo, os animais foram imunizados duas vezes com MOG, nos dias 0 e 7, a fim de aumentar a incidência de EAE, conforme descrito anteriormente (Stromnes e Goverman, 2006). No entanto, a possibilidade de dupla imunização com o MOG<sub>35-55</sub> induzir algum grau de tolerância em nossos animais  $B_1R^{-/-}$  precisa ser futuramente melhor investigado.

Além disso, neste mesmo estudo publicado por Schulze-Topphoff e colaboradores (2009), os autores demonstraram de forma inesperada que o tratamento dos animais com o agonista seletivo para o  $B_1R$  inibe a progressão da EAE, sugerindo que a ativação dos  $B_1R$  restringe a migração de células Th1 e Th17 auto-agressivas para o SNC (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009). Ao contrário, trabalho recentemente publicado demonstrou exatamente o contrário, ou seja, que o bloqueio dos  $B_1R$  inibe os sinais clínicos induzidos pela EAE através da modulação da permeabilidade da BHE (Gobel *et al.*, 2011). Por esta razão, estes dados contrastantes que foram publicados durante o desenvolvimento desta tese, nos impulsionaram a levantar a hipótese de que os receptores de bradicinina, especialmente o  $B_1R$ , poderiam apresentar um papel *dual* durante a gênese, desenvolvimento e a manutenção da EAE. A fim de testar esta hipótese, avaliamos o efeito dos antagonistas dos receptores de bradicinina em diferentes fases da doença, conforme listados a seguir: (1) Para avaliar o papel dos receptores de bradicinina durante a gênese da resposta auto-imune induzida pela EAE (**fase de indução**), os animais foram tratados com agonistas (DABK) e antagonistas seletivos (DALBK e HOE-140) para os  $B_1R$  e  $B_2R$ , durante os dias 0 ao dia 5 após a imunização; (2) Para avaliar a participação dos receptores de bradicinina em modular o desenvolvimento inicial da neuroinflamação induzida pela EAE (**fase aguda**), os animais foram tratados com os antagonistas/agonista durante 10 dias (início do tratamento dia 7 até o dia 17 após a imunização); e finalmente (3) a fim de analisar o efeito dos  $B_1R$  e  $B_2R$  em modular a EAE, após o surgimento dos sinais clínicos (**fase crônica**), os animais foram tratados com agonista/antagonistas durante 5 dias, assim que os primeiros sinais da EAE aparecem, ou seja, do dia 15 até o dia 20 após a imunização.

Inicialmente, durante a fase de indução da EAE, o tratamento preventivo com o antagonista do B<sub>1</sub>R, a DALBK (50 nmol/kg), foi capaz de bloquear os sinais clínicos, assim como a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE, enquanto que o bloqueio do B<sub>2</sub>R apresentou efeito parcial em inibir a progressão da EAE. Por outro lado, a administração do agonista do B<sub>1</sub>R, a DABK não inibiu o desenvolvimento da doença, além de ter aumentado a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE.

A dor crônica é um sintoma comum, porém pouco compreendido associada à EM (Archibald *et al.*, 1994; Svendsen *et al.*, 2003). A dor neuropática que surge devido às lesões/desmielinização ou neuroinflamação é a dor mais prevalente e de difícil tratamento nos pacientes com EM (Svendsen *et al.*, 2003). Atualmente, diversos trabalhos indicam que as cininas e seus receptores desempenham papel fundamental no controle e desenvolvimento da dor neuropática (Petersen *et al.*, 1998; Yamaguchi-Sase *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2007). No entanto, até o início deste projeto não existem dados na literatura sobre o efeito das cininas e seus receptores durante a dor neuropática induzida pela EAE. De forma interessante, o presente estudo demonstrou pela primeira vez que a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE é regulada por ambos os receptores das cininas B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R. De acordo com os nossos dados, outros autores têm demonstrado em outros modelos experimentais que o controle da dor neuropática está diretamente associado com a modulação dos receptores das cininas tanto em tecidos periféricos, tais como os gânglios da raiz dorsal (DRG), assim como em regiões específicas do SNC (Ferreira *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2007; Quintao *et al.*, 2008; Luiz *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2010). Além disso, níveis plasmáticos aumentados de BK foram encontrados em pacientes com dor neuropática (Blair *et al.*, 1998), assim como foi observado aumento na expressão do B<sub>1</sub>R e do B<sub>2</sub>R na lâmina superficial da medula espinhal e DRG, os quais estão associados com o sistema nervoso sensorial (Huang *et al.*, 2000; Couture *et al.*, 2001). Uma vez formada na periferia, as cininas ativam fibras A $\delta$  e C em neurônios sensoriais, produzindo dor, hiperalgesia ou alodínia em humanos, assim como em modelos experimentais (Calixto *et al.*, 2004). Desta forma, os nossos dados sugerem que o bloqueio de ambos os receptores das cininas B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R durante a fase de indução da EAE, impedem que as cininas, por exemplo, BK e DABK desensibilizem as fibras A $\delta$  e C, conseqüentemente impedindo a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE.



Corroborando com os dados do presente trabalho, já foi demonstrado que a administração de antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R (DALBK) ou para o B<sub>2</sub>R (HOE-140) inibiu significativamente a alodínia mecânica e térmica em ratos submetidos à ligação unilateral do nervo espinhal L5/L6 (Werner *et al.*, 2007). Além disso, estudo recente publicado por Ferreira e colaboradores (Ferreira *et al.*, 2005) demonstrou que a deleção do gene ou a inibição farmacológica do receptor B<sub>1</sub> em ratos inibiu, de maneira significativa, a hipersensibilidade nociceptiva associada com a lesão parcial do nervo ciático. Este efeito apareceu um dia depois de submeter os animais à lesão e continuou a ser significativo até o vigésimo oitavo dia após a cirurgia, sugerindo que o B<sub>1</sub>R é crucial para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. Outro estudo interessante demonstrou o envolvimento dos receptores para as cininas no modelo de dor neuropática induzida pela avulsão do plexo braquial (Quintao *et al.*, 2008). Neste estudo, os autores demonstraram que tanto a hiperalgesia mecânica quanto a térmica foram abolidas em camundongos nocautes para o B<sub>1</sub>R após a avulsão do plexo braquial. No entanto, os animais nocautes para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) apresentaram redução parcial na hipernocicepção mecânica após a avulsão. Os dados obtidos em nosso estudo confirmam e estendem esses estudos prévios, os quais sugerem que os receptores para as cininas, especialmente o subtipo B<sub>1</sub> parecem exercer papel dominante no controle da hiperalgesia mecânica induzida pela EAE em camundongos. Entretanto, ainda é preciso esclarecer se a expressão dos receptores para as cininas encontram-se aumentados nos tecidos periféricos, espinhais e/ou supra-espinhais após a imunização com MOG<sub>35-55</sub>.

Diferentes estudos demonstraram que durante a fase de indução da EAE ou durante o desenvolvimento da EM, as células T são ativadas em órgãos linfóides periféricos por antígenos virais e/ou bacterianos, os quais apresentam mimetismo molecular com alguns antígenos do SNC (Sospedra e Martin, 2005). Desta forma, os linfócitos T auto-reativos passam a reconhecer os antígenos próprios (*self*) como não-próprios (*no-self*), caracterizando assim a doença auto-imune. Em seguida, os linfócitos T auto-reativos são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e podem ser diferenciados em Th1 (IFN- $\gamma$ ) ou em linfócitos Th17 (IL-17, IL-22, IL-21), através dos fatores de transcrição T-bet e ROR- $\gamma$ T, respectivamente (Mcfarland e Martin, 2007).

Nossos resultados demonstraram que o bloqueio dos receptores das cininas, principalmente o subtipo B<sub>1</sub>R, durante a fase de indução da

EAE (dia 0 ao dia 7) inibiu a resposta Th1 e Th17, através do bloqueio da produção de citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 nos órgãos linfóides periféricos como, por exemplo, linfonodos e baço. Além disso, o bloqueio de B<sub>1</sub>R na fase de indução da EAE restaurou os níveis de IL-4 em células dos linfonodos e do baço *in vitro* após estimulação com MOG<sub>35-55</sub>, sugerindo que o B<sub>1</sub>R pode induzir mudança dos linfócitos Th1 e Th17 para o fenótipo Th2. A inibição do B<sub>1</sub>R na fase de imunização EAE também reduziu a proliferação dos linfócitos T auto-reativos nos tecidos linfóides, e células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> reativas à MOG de animais nocautes B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> ou de camundongos pré-tratados com a DALBK ou com o HOE-140 apresentaram redução significativa na expressão CD69, o marcador de ativação celular. Em conjunto, os nossos dados sugerem que o bloqueio do B<sub>1</sub>R durante a fase de indução da EAE inibe a diferenciação, ativação e proliferação de linfócitos encefalitogênicos Th1 e Th17 nos órgãos linfóides periféricos, os quais conseqüentemente não migram para o SNC de forma eficaz e também não induzem neuroinflamação. De fato, trabalhos anteriores sugerem que a modulação do microambiente nos órgãos linfóides periféricos durante a apresentação de antígenos e ativação celular, altera a resposta imune e, em seguida, o curso da doença, principalmente diminuindo a resposta das células T MOG-específicas e a produção de auto-anticorpos (Mycko *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Ellestad *et al.*, 2009; Terenyi *et al.*, 2009). De acordo com nossos dados, estudo realizado por Aliberti e colaboradores demonstrou que as cininas podem servir como um sinal de alerta que desencadeia a ativação de células dendríticas, assim como a polarização de células T, o que significa que as cininas podem modular a resposta imune no início da doença (Aliberti *et al.*, 2003).

Outro aspecto interessante investigado no presente estudo foi o fato de que, após a ativação nos órgãos linfóides periféricos, as células T CD4<sup>+</sup> efetivamente migraram para o SNC, caracterizando assim a fase aguda da EAE (dia 7 ao dia 17 após a imunização). De maneira interessante, a administração do antagonista do B<sub>1</sub>R não foi capaz de inibir o desenvolvimento da EAE. Por outro lado, a ativação do B<sub>1</sub>R, avaliada através do tratamento com o agonista DABK, inibiu a progressão da EAE sugerindo que o B<sub>1</sub>R poderia modular o surgimento da inflamação no SNC. Além disso, durante a fase aguda da EAE, a ativação do B<sub>1</sub>R inibiu a resposta neuroinflamatória induzida pelos linfócitos Th1 e Th17, através da modulação do aumento da permeabilidade da BHE.

Conforme ilustrado na introdução desta tese, o rompimento da seletividade da BHE é uma etapa fundamental para o desenvolvimento da resposta inflamatória no SNC, característico da EM (Weiss *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2011). De acordo com os nossos dados, trabalho recente demonstrou que o agonista seletivo para o B<sub>1</sub>R, o R838 administrado do dia 0 ao dia 10 após a indução da EAE, inibiu de maneira significativa, a severidade clínica da EAE, após a transferência de linfócitos T reativos a proteína do proteolípídeo (PLP<sub>139-151</sub>) (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009). Uma ressalva necessária e interessante, é que, o período de tratamento dos animais neste trabalho previamente publicado (*imunização passiva*: dia 0 ao dia 10 após a transferência de linfócitos T auto-reativos) (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009), pode ser facilmente comparado com a *fase aguda* da EAE em nosso trabalho (dia 7 ao dia 17), uma vez que em ambos os modelos a resposta imune periférica inicial já ocorreu e os linfócitos T auto-reativos estão neste momento migrando para o SNC. Por esta razão, durante a fase aguda da EAE pode-se avaliar o início da resposta imunológica contra a bainha de mielina, assim como a migração de células Th1 e Th17 encefalitogênicas para o SNC (Stromnes e Goverman, 2006). Baseado nestes resultados é possível sugerir que a ativação do B<sub>1</sub>R, durante a fase aguda da EAE, parece bloquear a inflamação do SNC, assim como controla a migração de células T pró-inflamatórias MOG-reativos para o SNC, através da modulação da permeabilidade da BHE, conforme já descrito anteriormente (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009). No entanto, o efeito do agonista do B<sub>1</sub>R, durante a fase aguda da EAE, pode ser exercido diretamente nas células endoteliais, ou indiretamente através da regulação das células T encefalitogênicas, conforme já sugerido (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009; Gobel *et al.*, 2011).

Recentemente foi demonstrado que o B<sub>1</sub>R controla a expressão de moléculas aderentes (*tight-junctions*), tais como claudina-5, ocludina e zonula occludens-1 (ZO-1) nas células endoteliais da BHE (Gobel *et al.*, 2011). Assim é possível sugerir que durante a fase aguda da EAE, o B<sub>1</sub>R parece manter a integridade da BHE através de ação direta nas células endoteliais da própria barreira, e assim inibir a migração e a entrada dos linfócitos Th1 e Th17 encefalitogênicos para dentro do SNC. Por outro lado, enquanto a DABK, agonista do B<sub>1</sub>R, durante a fase aguda da EAE foi capaz de inibir o aumento da permeabilidade da BHE e conseqüentemente o desenvolvimento da EAE, dados recentes da literatura têm mostrado que a bradicinina (BK), agonista seletivo para o receptor B<sub>2</sub>, aumentou seletivamente a permeabilidade da BHE, através

da liberação da citocina pró-inflamatória, o TNF- $\alpha$  (Zhang *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2009). Além disso, o agonista do B<sub>2</sub>R, conhecido comercialmente como Cereport<sup>®</sup> (RMP-7) tem sido administrado clinicamente por via intracarótida, com o objetivo de aumentar a permeabilidade da BHE e, conseqüentemente, melhorar a biodisponibilidade de agentes quimioterápicos em áreas de tumores cerebrais (Elliott *et al.*, 1996; Emerich *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Mais recentemente, um estudo interessante realizado por Liu e colaboradores demonstrou que a BK aumentou a permeabilidade da BHE por diminuir os níveis de expressão de moléculas de adesão, tais como zonula occludens-1 (ZO-1), ocludina e claudina-5, além de reorganizar os filamentos de actina que compõem o citoesqueleto (Liu *et al.*, 2008). Baseado nestas informações é possível sugerir que durante a fase aguda da EAE a ativação do B<sub>1</sub>R, mas não do B<sub>2</sub>R, parecer ser importante para inibir a progressão da EAE, através da modulação da permeabilidade da BHE.

Após a expansão, ativação e proliferação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> encefalitogênicos nos órgãos linfóides periféricos, estas células migram e entram no espaço subaracnóideo do SNC, através do líquido cefalorraquidiano (LCR), plexo coróide ou vênulas meníngeais, caracterizando assim a fase crônica da EAE. Dentro do SNC, as células T auto-reativas são re-ativadas por macrófagos/microglia e células dendríticas, além dos astrócitos, os quais re-apresentam epítomos da mielina através da molécula de MHC de classe II. Em seguida, as células T auto-reativas, juntamente com a microglia e os astrócitos, entram no parênquima cerebral e secretam mediadores inflamatórios, os quais em conjunto, induzem a neuroinflamação e a desmielinização. Além disso, a resposta inflamatória no SNC é capaz de atrair células inflamatórias da circulação sanguínea para o SNC (Goverman, 2009). No SNC de indivíduos saudáveis, os macrófagos/microglia expressando MHC de classe II são as células predominantes no espaço perivascular, assim como no líquido, embora algumas células dendríticas (*dendritic cells: DCs*), tais como os astrócitos também podem ser detectados (Goverman, 2009). Entretanto, apesar da baixa abundância de DCs nestes compartimentos, estudos anteriores demonstraram que o bloqueio do MHC de classe II nas DCs é suficiente para inibir o desenvolvimento da EAE (Greter *et al.*, 2005), e que células dendríticas de origem mielóide dentro do SNC são capazes de ativar células T reativas à mielina recrutadas durante a neuroinflamação, assim como são capazes de facilitar a diferenciação destes linfócitos para o subtipo Th17 (Bailey

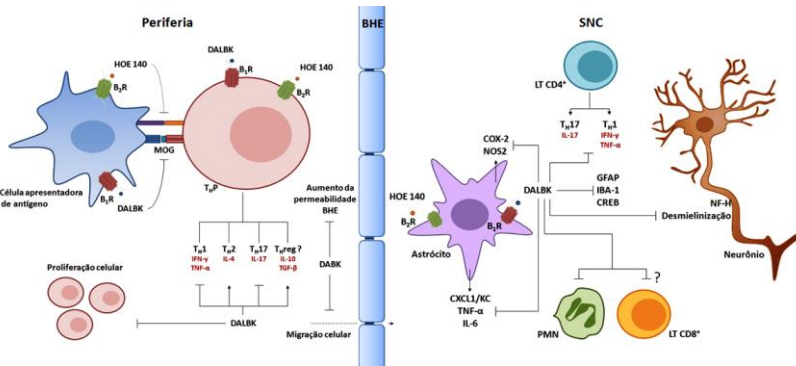
*et al.*, 2007). Durante a neuroinflamação, os astrócitos expressam MHC de classe II, assim como moléculas co-estimulatórias após a exposição ao IFN- $\gamma$  (Nikceovich *et al.*, 1997). Embora o seu papel como célula apresentadora de antígenos (APCs) *in vivo* ainda seja controverso, os astrócitos influenciam a resposta inflamatória através da produção de quimiocinas e citocinas. De maneira interessante, os nossos resultados demonstraram que o tratamento dos animais com o antagonista do B<sub>1</sub>R, a DALBK, durante a fase crônica da EAE, inibiu os sinais clínicos e a resposta inflamatória no SNC aparentemente através da modulação das células gliais como, por exemplo, a microglia e os astrócitos. O bloqueio do B<sub>1</sub>R durante a fase crônica da EAE também preveniu o dano axonal induzido pela EAE. Além disso, o pré-tratamento com o antagonista do B<sub>1</sub>R (DALBK) bloqueou, de forma significativa, os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e de CXCL1/KC, assim como o RNAm para a COX-2 e NOS2 em cultura primária de astrócitos estimulados com IFN- $\gamma$  *in vitro*. No entanto, o bloqueio do B<sub>2</sub>R com o antagonista HOE-140 apresentou inibição apenas parcial nos níveis e na expressão destes mediadores inflamatórios produzidos pelos astrócitos *in vitro*.

Um aspecto importante que merece atenção é que durante a fase crônica da EAE, devido à natureza peptídica dos antagonistas utilizados neste estudo, a DALBK, a DABK e o HOE-140, é bastante improvável que, quando administrados sistemicamente (via intraperitoneal), estes antagonistas atravessem a BHE para bloquear os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas dentro do SNC. No entanto, alguns estudos recentes sugerem que durante condições neuroinflamatórias podem ocorrer danos dos componentes celulares da BHE, que por sua vez facilitam a infiltração de leucócitos, os quais induzem à morte de oligodendrócitos, dano axonal e progressão da desmielinização (Alvarez *et al.*, 2011). Por esta razão, o efeito observado para o antagonista do B<sub>1</sub>R dentro do SNC poderia ser justificado por esta droga ser capaz de penetrar no SNC, após a quebra da BHE. Corroborando com os dados do presente estudo, Gobel e colaboradores (2011), observaram que o tratamento sistêmico com o antagonista do B<sub>1</sub>R (R715) iniciado logo após o surgimento dos primeiros sinais clínicos associados com a EAE (fase crônica), inibiu de maneira significativa, o desenvolvimento da EAE (Gobel *et al.*, 2011). Em conjunto, estes dados permitem-nos sugerir que, após a ruptura da BHE durante a fase crônica da EAE, o antagonista do B<sub>1</sub>R, a DALBK, poderia entrar no SNC e, dessa maneira, inibir a progressão da EAE por afetar, principalmente, a função celular dos astrócitos.

Desta forma, os resultados analisados em conjunto nos permitem concluir que o B<sub>1</sub>R apresenta papel *dual* durante o desenvolvimento da EAE. De acordo com os nossos dados, alguns estudos já publicados sugerem que um mesmo alvo terapêutico pode apresentar ações duplas ou múltiplas durante o desenvolvimento da EAE. Dentre alguns exemplos podemos citar: (1) a depleção de células do sistema inune inato, tais como os macrófagos suprime o surgimento e o desenvolvimento da EAE, porém impedem de forma significativa a regeneração axonal, assim como a re-mielinização (Huitinga *et al.*, 1990; Kotter *et al.*, 2001); (2) a prostaglandinas E-2 (PGE<sub>2</sub>) induz a ativação e a proliferação de linfócitos Th1 e Th17 encefalitogênicos e deste modo acelera o desenvolvimento e a severidade da EAE, porém também estabiliza a BHE e conseqüentemente, neutraliza os efeitos neurotóxicos dos linfócitos T auto-reativos (Esaki *et al.*, 2010); (3) a osteopontina aumenta a resposta Th1, em contrapartida tem um papel fundamental durante a re-mielinização, além de ser neuroprotetora (Braitch e Constantinescu, 2010) e por fim (4) um interessante estudo demonstrou que o fator ativador de plaquetas (PAF) apresenta efeito *dual* durante a progressão da EAE. Durante a fase de indução da EAE, o PAF pode ser produzido pelas células endoteliais do SNC, conseqüentemente é capaz de induzir a quebra da BHE e, por fim, causar a neuroinflamação. Já na fase aguda, a expressão do PAF está associada com o controle da resposta inflamatória periférica e central. Por outro lado, durante a fase crônica da EAE, o PAF exacerba a neuroinflamação e a desmielinização por induzir a liberação de mediadores inflamatórios como, por exemplo, o TNF- $\alpha$  (Kihara *et al.*, 2005).

O presente estudo demonstrou o importante papel exercido pelas cininas e pelos seus respectivos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> no controle da EAE induzida por MOG<sub>35-55</sub> em camundongos C57BL/6, assim como corrobora para esclarecer alguns mecanismos pelos quais os antagonista/agonista do B<sub>1</sub>R modulam o desenvolvimento e a progressão da EAE. Além disso, os dados do presente estudo demonstraram que o B<sub>1</sub>R é um mediador fundamental nesta doença e sugerem ainda que o receptor B<sub>1</sub> para as cininas apresenta papel *dual* no controle da progressão da EAE, por atuar de mecanismos distintos nos diferentes estágios da doença. Neste contexto, o antagonismo do B<sub>1</sub>R parece bloquear o desenvolvimento da EAE por afetar, principalmente os linfócitos encefalitogênicos Th1 e Th17, tanto nos órgãos linfóides periféricos, quanto no SNC, assim como por inibir a ativação das células

gliais, tais como a microglia e os astrócitos (ver esquema proposto na Figura 42) (Dutra, R. C. *et al.*, 2011). Além disso, os nossos resultados confirmam e estendem os dados anteriores demonstrando que o B<sub>2</sub>R apresenta papel menos importante em controlar a neuroinflamação induzida pela EAE (Dos Santos *et al.*, 2008; Gobel *et al.*, 2011), o que corrobora ainda com os relatos já bem estabelecidos na literatura de que os B<sub>1</sub>R são expressos durante as respostas inflamatórias, enquanto que o B<sub>2</sub>R controla as funções fisiológicas das cininas (Couture *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2004; Marceau e Regoli, 2004).



**Figura 42. Representação esquemática dos possíveis mecanismos através dos quais as cininas atuando nos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> regulam a patogênese da EAE induzida por MOG<sub>35-55</sub> em camundongos C57BL/6.** O bloqueio do B<sub>1</sub>R durante a fase de indução (dia 0 ao dia 5) ou crônica (dia 15 – 20) da EAE inibiu de maneira significativa o desenvolvimento e a progressão da EAE, respectivamente, através da supressão dos linfócitos encefalitogênicos Th1 e Th17 MOG-reativos em dois diferentes estágios: (1) durante o surgimento da resposta imune periférica específica à MOG<sub>35-55</sub> nos órgãos linfóides, através da inibição da expansão, ativação e proliferação de linfócitos Th auto-reativos, e (2) durante a neuroinflamação por afetar as células Th1 e Th17 reativas à MOG<sub>35-55</sub>, assim como a ativação das células gliais, principalmente, os astrócitos. No entanto, o bloqueio do B<sub>1</sub>R durante a fase aguda da EAE (dia 7 – 17) não foi capaz de inibir o desenvolvimento da EAE, enquanto que a administração do agonista seletivo para o B<sub>1</sub>R, a DABK, neste mesmo estágio da doença, reduziu, de maneira significativa, a progressão da EAE, através da inibição do aumento da permeabilidade da BHE e, conseqüentemente a migração de células inflamatórias para o SNC e, por fim, a neuroinflamação. Em conjunto, os nossos dados sugerem que o B<sub>1</sub>R apresenta papel *dual* durante a progressão da EAE através de distintos mecanismos de ação em cada estágio da doença. Por outro lado, o B<sub>2</sub>R apresenta papel menos importante em controlar o desenvolvimento da EAE em camundongos C57BL/6. DALBK: des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradicinina (BK); HOE-140: D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>, Thi<sup>5</sup>, D-Tic<sup>7</sup>, Oic<sup>8</sup>]-BK; DABK: des-Arg<sup>9</sup>-BK; MOG: glicoproteína da mielina do oligodendrócitos; B<sub>1</sub>R: receptor B<sub>1</sub> para as cininas; B<sub>2</sub>R: receptor B<sub>2</sub> para as cininas; ThP: precursor de célula T; BHE: barreira hemato-encefálica; CXCL1/KC: quimiocina derivada de queratinócitos; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento beta; PMN: leucócitos polimorfonucleares; NF-H: neurofilamento H; GFAP: proteína fibrilar glial ácida; Iba-1: molécula adaptadora do tipo 1 de ligação de cálcio ionizado. (←) inibição; (→) estimulação.



## 6 SUMÁRIO E CONCLUSÕES

- ✓ **Fase de indução da EAE:** a deleção gênica e/ou o uso de antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R das cininas inibiu os sinais clínicos, a hiperalgesia mecânica e o desenvolvimento da EAE. Além disso, o bloqueio do B<sub>1</sub>R diminuiu as células inflamatórias, a perda de mielina, a ativação de linfócitos T e astrócitos, assim como a expressão do fator de transcrição CREB no SNC. De forma significativa, o bloqueio do B<sub>1</sub>R durante a fase de indução também inibiu a expansão/ativação/proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como a produção de citocinas efetoras em tecidos linfóides periféricos e no SNC.
- ✓ **Fase aguda da EAE:** o agonista seletivo para o B<sub>1</sub>R das cininas, a DABK, inibiu os sinais clínicos e o desenvolvimento da EAE, assim como suprimiu os linfócitos Th17 e Th1 no SNC. Além disso, a ativação do B<sub>1</sub>R durante a fase aguda da EAE reduziu a permeabilidade da BHE.
- ✓ **Fase crônica da EAE:** o antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R das cininas, a DALBK, inibiu os sinais clínicos da EAE, assim como a infiltração de células inflamatórias, a perda de mielina e a ativação de células gliais no SNC, após a indução da EAE. Além disso, os antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> das cininas bloquearam a liberação e expressão de mediadores pró-inflamatórios pelos astrócitos *in vitro*.

Assim, os nossos dados analisados em conjunto nos permitem concluir que os receptores para as cininas, especialmente o subtipo B<sub>1</sub>R, podem constituir opções relevantes para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento dos pacientes com EM, bem como para o tratamento de outras doenças auto-imunes, nas quais as células Th1 e Th17 desempenham papel relevante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, A., C. Blais, Jr. e G. Loute. [Kinins: their nature and their potential role in the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors]. Nephrologie, v.21, n.4, p.163-72. 2000.
- Ahluwalia, A. e M. Perretti. B1 receptors as a new inflammatory target. Could this be the 1? Trends Pharmacol Sci, v.20, n.3, Mar, p.100-4. 1999.
- Al-Omaishi, J., R. Bashir e H. E. Gendelman. The cellular immunology of multiple sclerosis. J Leukoc Biol, v.65, n.4, Apr, p.444-52. 1999.
- Aliberti, J., J. P. Viola, A. Vieira-De-Abreu, P. T. Bozza, A. Sher e J. Scharfstein. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. J Immunol, v.170, n.11, Jun 1, p.5349-53. 2003.
- Alvarez, J. I., R. Cayrol e A. Prat. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. Biochim Biophys Acta, v.1812, n.2, Feb, p.252-64. 2011.
- Amorim, D. S., S. H. Ferreira, J. C. Manco, A. Tanaka, A. A. Sader e S. Cardoso. Potentiation of circulatory effects of bradykinin by a factor contained in the Bothrops jararaca venom. Cardiologia, v.50, n.1, p.23-32. 1967.
- Andreeva, L. e H. P. Rang. Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from the rat spinal cord in vitro. Br J Pharmacol, v.108, n.1, Jan, p.185-90. 1993.
- Archibald, C. J., P. J. McGrath, P. G. Ritvo, J. D. Fisk, V. Bhan, C. E. Maxner e T. J. Murray. Pain prevalence, severity and impact in a clinic sample of multiple sclerosis patients. Pain, v.58, n.1, Jul, p.89-93. 1994.
- Bailey, S. L., B. Schreiner, E. J. McMahon e S. D. Miller. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. Nat Immunol, v.8, n.2, Feb, p.172-80. 2007.
- Bakhle, Y. S. Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung. Nature, v.220, n.5170, Nov 30, p.919-21. 1968.
- Bakhle, Y. S., A. M. Reynard e J. R. Vane. Metabolism of the angiotensins in isolated perfused tissues. Nature, v.222, n.5197, Jun 7, p.956-9. 1969.
- Baranzini, S. E., J. Mudge, J. C. Van Velkinburgh, P. Khankhanian, I. Khrebtukova, N. A. Miller, L. Zhang, A. D. Farmer, C. J. Bell, R. W. Kim, G. D. May, J. E. Woodward, S. J. Caillier, J. P. Mcelroy, R. Gomez, M. J. Pando, L. E. Clendenen, E. E. Ganusova, F. D. Schilkey, T. Ramaraj, O. A. Khan, J. J. Huntley, S. Luo, P. Y. Kwok, T. D. Wu, G. P. Schroth, J. R. Oksenberg, S. L. Hauser e S. F. Kingsmore.

- Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. Nature, v.464, n.7293, Apr 29, p.1351-6. 2010.
- Barten, L. J., D. R. Allington, K. A. Procacci e M. P. Rivey. New approaches in the management of multiple sclerosis. Drug Des Devel Ther, v.4, p.343-66. 2011.
- Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka e V. K. Kuchroo. Induction and effector functions of T(H)17 cells. Nature, v.453, n.7198, Jun 19, p.1051-7. 2008.
- Bisogno, T. e V. Di Marzo. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: role in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. CNS Neurol Disord Drug Targets, v.9, n.5, Nov, p.564-73. 2010.
- Bjartmar, C. e B. D. Trapp. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. Curr Opin Neurol, v.14, n.3, Jun, p.271-8. 2001.
- Bjartmar, C., J. R. Wujek e B. D. Trapp. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. J Neurol Sci, v.206, n.2, Feb 15, p.165-71. 2003.
- Blair, S. J., M. Chinthagada, D. Hoppenstedt, R. Kijowski e J. Fareed. Role of neuropeptides in pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy. Acta Orthop Belg, v.64, n.4, Dec, p.448-51. 1998.
- Bosch, X., A. Saiz e M. Ramos-Casals. Monoclonal antibody therapy-associated neurological disorders. Nat Rev Neurol, v.7, n.3, Mar, p.165-72. 2011.
- Bradl, M. e R. Hohlfeld. Molecular pathogenesis of neuroinflammation. J Neurol Neurosurg Psychiatry, v.74, n.10, Oct, p.1364-70. 2003.
- Braitch, M. e C. S. Constantinescu. The role of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and multiple sclerosis (MS). Inflamm Allergy Drug Targets, v.9, n.4, Sep, p.249-56. 2010.
- Brundula, V., N. B. Rewcastle, L. M. Metz, C. C. Bernard e V. W. Yong. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. Brain, v.125, n.Pt 6, Jun, p.1297-308. 2002.
- Bryant, C. D., N. N. Zhang, G. Sokoloff, M. S. Fanselow, H. S. Ennes, A. A. Palmer e J. A. Mcroberts. Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. J Neurogenet, v.22, n.4, p.315-31. 2008.
- Calixto, J. B., D. A. Cabrini, J. Ferreira e M. M. Campos. Kinins in pain and inflammation. Pain, v.87, n.1, Jul, p.1-5. 2000.

Calixto, J. B., R. Medeiros, E. S. Fernandes, J. Ferreira, D. A. Cabrini e M. M. Campos. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. Br J Pharmacol, v.143, n.7, Dec, p.803-18. 2004.

Calixto, J. B., C. Scheidt, M. Otuki e A. R. Santos. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. Expert Opin Emerg Drugs, v.6, n.2, Oct, p.261-79. 2001.

Callegaro, D., M. A. Lana-Peixoto, M. A. Moreira, P. E. Marchiori, L. A. Bacheschi, W. O. Arruda, G. B. Campos, A. M. Lino, A. S. Melo, F. C. Rocha, M. L. Ferreira, L. Ataíde, Jr. e D. R. Maciel. [The BCTRIMS Expanded Consensus on treatment of multiple sclerosis: I. The evidences for the use of immunosuppressive agents, plasma exchange and autologous hematopoietic stem cell transplantation]. Arq Neuropsiquiatr, v.60, n.3-B, Sep, p.869-74. 2002.

Campbell, D. J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. Int J Biochem Cell Biol, v.35, n.6, Jun, p.784-91. 2003.

Campos, M. M., P. C. Leal, R. A. Yunes e J. B. Calixto. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. Trends Pharmacol Sci, v.27, n.12, Dec, p.646-51. 2006.

Carola, V. e C. Gross. BDNF moderates early environmental risk factors for anxiety in mouse. Genes Brain Behav, v.9, n.4, Jun 1, p.379-89. 2010.

Cassim, B., O. M. Shaw, M. Mazur, N. L. Misso, A. Naran, D. R. Langlands, P. J. Thompson e K. D. Bhoola. Kallikreins, kininogens and kinin receptors on circulating and synovial fluid neutrophils: role in kinin generation in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), v.48, n.5, May, p.490-6. 2009.

Cohen, J. e G. P. Wilkin. Neural cell culture : a practical approach. Oxford: IRL Press. 1995. xx, 248p. p.

Coo, H. e K. J. Aronson. A systematic review of several potential non-genetic risk factors for multiple sclerosis. Neuroepidemiology, v.23, n.1-2, Jan-Apr, p.1-12. 2004.

Costa, R., E. M. Motta, R. C. Dutra, M. N. Manjavachi, A. F. Bento, F. R. Malinsky, J. B. Pesquero e J. B. Calixto. Anti-nociceptive effect of kinin B(1) and B(2) receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice. Br J Pharmacol, Apr 6. 2011.

Couture, R., M. Harrison, R. M. Vianna e F. Cloutier. Kinin receptors in pain and inflammation. Eur J Pharmacol, v.429, n.1-3, Oct 19, p.161-76. 2001.

- Crawford, M. P., S. X. Yan, S. B. Ortega, R. S. Mehta, R. E. Hewitt, D. A. Price, P. Stastny, D. C. Douek, R. A. Koup, M. K. Racke e N. J. Karandikar. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. Blood, v.103, n.11, Jun 1, p.4222-31. 2004.
- Crusio, W. E., D. Goldowitz, A. Holmes e D. Wolfer. Standards for the publication of mouse mutant studies. Genes Brain Behav, v.8, n.1, Feb, p.1-4. 2009.
- Danielisova, V., M. Gottlieb, M. Nemethova, P. Kravcukova, I. Domorakova, E. Mechirova e J. Burda. Bradykinin postconditioning protects pyramidal CA1 neurons against delayed neuronal death in rat hippocampus. Cell Mol Neurobiol, v.29, n.6-7, Sep, p.871-8. 2009.
- Dias, J. P., S. Talbot, J. Senecal, P. Carayon e R. Couture. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. PLoS One, v.5, n.9, p.e12622. 2010.
- Ding-Zhou, L., I. Margaille, B. Palmier, D. Pruneau, M. Plotkine e C. Marchand-Verrecchia. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. Br J Pharmacol, v.139, n.8, Aug, p.1539-47. 2003.
- Dornelles, F. N., D. S. Santos, T. E. Van Dyke, J. B. Calixto, E. L. Batista, Jr. e M. M. Campos. In vivo up-regulation of kinin B1 receptors after treatment with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in rat paw. J Pharmacol Exp Ther, v.330, n.3, Sep, p.756-63. 2009.
- Dos Santos, A. C., E. Roffe, R. M. Arantes, L. Juliano, J. L. Pesquero, J. B. Pesquero, M. Bader, M. M. Teixeira e J. Carvalho-Tavares. Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. J Neuroinflammation, v.5, p.49. 2008.
- Drapeau, G., D. Deblois e F. Marceau. Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins. J Pharmacol Exp Ther, v.259, n.3, Dec, p.997-1003. 1991.
- Dray, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. Can J Physiol Pharmacol, v.75, n.6, Jun, p.704-12. 1997.
- Duka, I., S. Shenouda, C. Johns, E. Kintsurashvili, I. Gavras e H. Gavras. Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. Hypertension, v.38, n.6, Dec 1, p.1355-60. 2001.
- Dutra, R., M. Cola, D. Leite, A. Bento, R. Claudino, A. Nascimento, P. Leal e J. Calixto. Inhibitor of PI3Kgamma ameliorates TNBS-induced colitis in mice by

affecting the functional activity of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells. Br J Pharmacol, v.163, Jan 19, p.358-374. 2011.

Dutra, R. C., D. F. Leite, A. F. Bento, M. N. Manjavachi, E. S. Patricio, C. P. Figueiredo, J. B. Pesquero e J. B. Calixto. The Role of Kinin Receptors in Preventing Neuroinflammation and Its Clinical Severity during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. PLoS One, v.6, n.11, p.e27875. 2011.

Ehrenfeld, P., I. Conejeros, M. F. Pavicic, C. E. Matus, C. B. Gonzalez, A. F. Quest, K. D. Bhoola, M. T. Poblete, R. A. Burgos e C. D. Figueroa. Activation of kinin B1 receptor increases the release of metalloproteases-2 and -9 from both estrogen-sensitive and -insensitive breast cancer cells. Cancer Lett, v.301, n.1, Feb 1, p.106-18. 2011.

Ellestad, K. K., S. Tsutsui, F. Noorbakhsh, K. G. Warren, V. W. Yong, Q. J. Pittman e C. Power. Early life exposure to lipopolysaccharide suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. J Immunol, v.183, n.1, Jul 1, p.298-309. 2009.

Elliott, P. J., N. J. Hayward, M. R. Huff, T. L. Nagle, K. L. Black e R. T. Bartus. Unlocking the blood-brain barrier: a role for RMP-7 in brain tumor therapy. Exp Neurol, v.141, n.2, Oct, p.214-24. 1996.

Emerich, D. F., R. L. Dean, J. Marsh, M. Pink, D. Lafreniere, P. Snodgrass e R. T. Bartus. Intravenous cereport (RMP-7) enhances delivery of hydrophilic chemotherapeutics and increases survival in rats with metastatic tumors in the brain. Pharm Res, v.17, n.10, Oct, p.1212-9. 2000.

Engel, C., B. Greim e U. K. Zetzl. Diagnostics of cognitive dysfunctions in multiple sclerosis. J Neurol, v.254 Suppl 2, May, p.II30-4. 2007.

Engelhardt, B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. J Neural Transm, v.113, n.4, Apr, p.477-85. 2006.

Esaki, Y., Y. Li, D. Sakata, C. Yao, E. Segi-Nishida, T. Matsuoka, K. Fukuda e S. Narumiya. Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.107, n.27, Jul 6, p.12233-8. 2010.

Farina, C., M. Krumbholz, T. Giese, G. Hartmann, F. Aloisi e E. Meinl. Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. J Neuroimmunol, v.159, n.1-2, Feb, p.12-9. 2005.

Ferreira, J., A. Beirith, M. A. Mori, R. C. Araujo, M. Bader, J. B. Pesquero e J. B. Calixto. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. J Neurosci, v.25, n.9, Mar 2, p.2405-12. 2005.

- Ferreira, J., K. M. Triches, R. Medeiros, D. A. Cabrini, M. A. Mori, J. B. Pesquero, M. Bader e J. B. Calixto. The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. Neuropharmacology, v.54, n.3, Mar, p.597-604. 2008.
- Ferreira, S. H. A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of Bothrops Jararaca. Br J Pharmacol Chemother, v.24, Feb, p.163-9. 1965.
- Ferreira, S. H. e M. Rocha E Silva. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from Bothrops jararaca venom. Experientia, v.21, n.6, Jun 15, p.347-9. 1965.
- Frohman, E. M., M. K. Racke e C. S. Raine. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. N Engl J Med, v.354, n.9, Mar 2, p.942-55. 2006.
- Gerlai, R. Gene targeting: technical confounds and potential solutions in behavioral brain research. Behav Brain Res, v.125, n.1-2, Nov 1, p.13-21. 2001.
- Germain, L., J. Barabe e C. Galeano. Increased blood concentration of des-Arg9-bradykinin in experimental allergic encephalomyelitis. J Neurol Sci, v.83, n.2-3, Feb, p.211-7. 1988.
- Glass, C. K., K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto e F. H. Gage. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. Cell, v.140, n.6, Mar 19, p.918-34. 2010.
- Gobel, K., S. Pankratz, T. Schneider-Hohendorf, S. Bittner, M. K. Schuhmann, H. F. Langer, G. Stoll, H. Wiendl, C. Kleinschnitz e S. G. Meuth. Blockade of the kinin receptor B1 protects from autoimmune CNS disease by reducing leukocyte trafficking. J Autoimmun, v.36, n.2, Mar, p.106-14. 2011.
- Gobin, S. J., L. Montagne, M. Van Zutphen, P. Van Der Valk, P. J. Van Den Elsen e C. J. De Groot. Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions. Glia, v.36, n.1, Oct, p.68-77. 2001.
- Gorlach, C., T. Hortobagyi, S. Hortobagyi, Z. Benyo, J. Relton, E. T. Whalley e M. Wahl. Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. J Neurotrauma, v.18, n.8, Aug, p.833-8. 2001.
- Goverman, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. Nat Rev Immunol, May 15. 2009.
- Gresack, J. E., V. B. Risbrough, C. N. Scott, S. Coste, M. Stenzel-Poore, M. A. Geyer e S. B. Powell. Isolation rearing-induced deficits in contextual fear learning do not require CRF(2) receptors. Behav Brain Res, v.209, n.1, May 1, p.80-4. 2010.

Greter, M., F. L. Heppner, M. P. Lemos, B. M. Odermatt, N. Goebels, T. Laufer, R. J. Noelle e B. Becher. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. Nat Med, v.11, n.3, Mar, p.328-34. 2005.

Grigoriadis, N. e G. M. Hadjigeorgiou. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. J Autoimmune Dis, v.3, p.1. 2006.

Gunnarsson, M., C. Malmstrom, M. Axelsson, P. Sundstrom, C. Dahle, M. Vrethem, T. Olsson, F. Piehl, N. Norgren, L. Rosengren, A. Svenningsson e J. Lycke. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. Ann Neurol, v.69, n.1, Jan, p.83-9. 2011.

Guo, X., K. Nakamura, K. Kohyama, C. Harada, H. A. Behanna, D. M. Watterson, Y. Matsumoto e T. Harada. Inhibition of glial cell activation ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. Neurosci Res, v.59, n.4, Dec, p.457-66. 2007.

Haase, C. G., J. Guggenmos, U. Brehm, M. Andersson, T. Olsson, M. Reindl, J. M. Schneidewind, U. K. Zettl, F. Heidenreich, T. Berger, H. Wekerle, R. Hohlfeld e C. Linington. The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls. J Neuroimmunol, v.114, n.1-2, Mar 1, p.220-5. 2001.

Hafler, D. A. Multiple sclerosis. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  J Clin Invest, v.113, n.6, Mar, p.788-94. 2004.

Hara, D. B., D. F. Leite, E. S. Fernandes, G. F. Passos, A. O. Guimaraes, J. B. Pesquero, M. M. Campos e J. B. Calixto. The relevance of kinin B1 receptor upregulation in a mouse model of colitis. Br J Pharmacol, v.154, n.6, Jul, p.1276-86. 2008.

Hart, P. H., S. Gorman e J. J. Finlay-Jones. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? Nat Rev Immunol, v.11, n.9, Sep, p.584-96. 2010.

Hemmer, B., J. J. Archelos e H. P. Hartung. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Nat Rev Neurosci, v.3, n.4, Apr, p.291-301. 2002.

Huang, D., Y. Han, M. R. Rani, A. Glabinski, C. Trebst, T. Sorensen, M. Tani, J. Wang, P. Chien, S. O'bryan, B. Bielecki, Z. L. Zhou, S. Majumder e R. M. Ransohoff. Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. Immunol Rev, v.177, Oct, p.52-67. 2000.



Huizinga, I., N. Van Rooijen, C. J. De Groot, B. M. Uitdehaag e C. D. Dijkstra. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. J Exp Med, v.172, n.4, Oct 1, p.1025-33. 1990.

Ivashkova, Y., A. Svetnitsky, O. Mayzler, D. Pruneau, M. Benifla, Y. Fuxman, A. Cohen, A. A. Artru e Y. Shapira. Bradykinin B2 receptor antagonism with LF 18-1505T reduces brain edema and improves neurological outcome after closed head trauma in rats. J Trauma, v.61, n.4, Oct, p.879-85. 2006.

Johns, T. G. e C. C. Bernard. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. J Neurochem, v.72, n.1, Jan, p.1-9. 1999.

Kawakami, N., F. Odoardi, T. Ziemssen, M. Bradl, T. Ritter, O. Neuhaus, H. Lassmann, H. Wekerle e A. Flugel. Autoimmune CD4+ T cell memory: lifelong persistence of encephalitogenic T cell clones in healthy immune repertoires. J Immunol, v.175, n.1, Jul 1, p.69-81. 2005.

Khan, T. K., T. J. Nelson, V. A. Verma, P. A. Wender e D. L. Alkon. A cellular model of Alzheimer's disease therapeutic efficacy: PKC activation reverses Abeta-induced biomarker abnormality on cultured fibroblasts. Neurobiol Dis, v.34, n.2, May, p.332-9. 2009.

Kihara, Y., S. Ishii, Y. Kita, A. Toda, A. Shimada e T. Shimizu. Dual phase regulation of experimental allergic encephalomyelitis by platelet-activating factor. J Exp Med, v.202, n.6, Sep 19, p.853-63. 2005.

Kim, H., C. Moon, M. Ahn, Y. Lee, S. Kim, Y. Matsumoto, C. S. Koh, M. D. Kim e T. Shin. Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Res, v.1162, Aug 8, p.113-20. 2007.

Kiselycznyk, C. e A. Holmes. All (C57BL/6) Mice are not Created Equal. Front Neurosci, v.5, p.10. 2011.

Kivisakk, P., J. Imitola, S. Rasmussen, W. Elyaman, B. Zhu, R. M. Ransohoff e S. J. Khoury. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. Ann Neurol, v.65, n.4, Apr, p.457-69. 2009.

Kohler, G. e C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, v.256, n.5517, Aug 7, p.495-7. 1975.

Kotter, M. R., A. Setzu, F. J. Sim, N. Van Rooijen e R. J. Franklin. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysocleithin-induced demyelination. Glia, v.35, n.3, Sep, p.204-12. 2001.

Kozela, E., N. Lev, N. Kaushansky, R. Eilam, N. Rimmerman, R. Levy, A. Ben-Nun, A. Juknat e Z. Vogel. Cannabidiol Inhibits Pathogenic T-Cells, Decreases Spinal Microglial Activation and Ameliorates Multiple Sclerosis-Like Disease in C57bl/6 Mice. Br J Pharmacol, Mar 30. 2011.

Leadbetter, E. A., C. R. Bourque, B. Devaux, C. D. Olson, G. H. Sunshine, S. Hirani, B. P. Wallner, D. E. Smilek e M. P. Happ. Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide. J Immunol, v.161, n.1, Jul 1, p.504-12. 1998.

Linz, W., G. Wiemer, P. Gohlke, T. Unger e B. A. Scholkens. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. Pharmacol Rev, v.47, n.1, Mar, p.25-49. 1995.

Liu, L. B., Y. X. Xue, Y. H. Liu e Y. B. Wang. Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. J Neurosci Res, v.86, n.5, Apr, p.1153-68. 2008.

Liu, Y., K. Hashizume, Z. Chen, K. Samoto, N. Ningaraj, K. Asotra e K. L. Black. Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors. Neurol Res, v.23, n.4, Jun, p.379-87. 2001.

Lopez-Diego, R. S. e H. L. Weiner. Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary. Nat Rev Drug Discov, v.7, n.11, Nov, p.909-25. 2008.

Lourbopoulos, A., N. Grigoriadis, R. Lagoudaki, O. Touloumi, E. Polyzoidou, I. Mavromatis, N. Tascos, A. Breuer, H. Ovadia, D. Karussis, E. Shohami, R. Mechoulam e C. Simeonidou. Administration of 2-arachidonoylglycerol ameliorates both acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Res, v.1390, May 16, p.126-41. 2011.

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

Luiz, A. P., S. D. Schroeder, J. G. Chichorro, J. B. Calixto, A. R. Zampronio e G. A. Rae. Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. Neuropeptides, v.44, n.2, Apr, p.87-92. 2010.

- Maccio, D. R., G. Calfa e G. A. Roth. Oral testosterone in male rats and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroimmunomodulation, v.12, n.4, p.246-54. 2005.
- Madeddu, P., C. Emanuelli e S. El-Dahr. Mechanisms of disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. Nat Clin Pract Nephrol, v.3, n.4, Apr, p.208-21. 2007.
- Marceau, F. e D. R. Bachvarov. Kinin receptors. Clin Rev Allergy Immunol, v.16, n.4, Winter, p.385-401. 1998.
- Marceau, F. e D. Regoli. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. Nat Rev Drug Discov, v.3, n.10, Oct, p.845-52. 2004.
- Mcfarland, H. F. e R. Martin. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. Nat Immunol, v.8, n.9, Sep, p.913-9. 2007.
- Medeiros, R., D. A. Cabrini, J. Ferreira, E. S. Fernandes, M. A. Mori, J. B. Pesquero, M. Bader, M. C. Avellar, M. M. Campos e J. B. Calixto. Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. Circ Res, v.94, n.10, May 28, p.1375-82. 2004.
- Medeiros, R., R. D. Prediger, G. F. Passos, P. Pandolfo, F. S. Duarte, J. L. Franco, A. L. Dafre, G. Di Giunta, C. P. Figueiredo, R. N. Takahashi, M. M. Campos e J. B. Calixto. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. J Neurosci, v.27, n.20, May 16, p.5394-404. 2007.
- Moldovan, I. R., R. A. Rudick, A. C. Cotleur, S. E. Born, J. C. Lee, M. T. Karafa e C. M. Pelfrey. Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. J Neuroimmunol, v.141, n.1-2, Aug, p.132-40. 2003.
- Moore, F. G. e C. Wolfson. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. Acta Neurol Scand, v.106, n.2, Aug, p.63-83. 2002.
- Morales, Y., J. E. Parisi e C. F. Lucchinetti. The pathology of multiple sclerosis: evidence for heterogeneity. Adv Neurol, v.98, p.27-45. 2006.
- Moreau, M. E., P. Dubreuil, G. Molinaro, M. Chagnon, W. Muller-Esterl, Y. Lepage, F. Marceau e A. Adam. Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and inflammation. J Pharmacol Exp Ther, v.315, n.3, Dec, p.1065-74. 2005.

Mycko, M. P., H. Cwiklinska, A. Walczak, C. Libert, C. S. Raine e K. W. Selmaj. A heat shock protein gene (Hsp70.1) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. Eur J Immunol, v.38, n.7, Jul, p.1999-2013. 2008.

Neumann, H. Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. Curr Opin Neurol, v.16, n.3, Jun, p.267-73. 2003.

Ni, A., L. Chao e J. Chao. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. J Biol Chem, v.273, n.5, Jan 30, p.2784-91. 1998.

Nikceovich, K. M., K. B. Gordon, L. Tan, S. D. Hurst, J. F. Kroepfl, M. Gardinier, T. A. Barrett e S. D. Miller. IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. J Immunol, v.158, n.2, Jan 15, p.614-21. 1997.

Passos, G. F., E. S. Fernandes, M. M. Campos, J. G. Araujo, J. L. Pesquero, G. E. Souza, M. C. Avellar, M. M. Teixeira e J. B. Calixto. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. J Immunol, v.172, n.3, Feb 1, p.1839-47. 2004.

Petersen, M., A. S. Eckert, G. Segond Von Banchet, B. Heppelmann, A. Klusch e K. D. Kniffki. Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. Neuroscience, v.83, n.3, Apr, p.949-59. 1998.

Polfliet, M. M., F. Van De Veerdonk, E. A. Dopp, E. M. Van Kesteren-Hendriks, N. Van Rooijen, C. D. Dijkstra e T. K. Van Den Berg. The role of perivascular and meningeal macrophages in experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol, v.122, n.1-2, Jan, p.1-8. 2002.

Prat, A., K. Biernacki, S. Pouly, J. Nalbantoglu, R. Couture e J. P. Antel. Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. J Neuropathol Exp Neurol, v.59, n.10, Oct, p.896-906. 2000.

Prat, A., K. Biernacki, T. Saroli, J. E. Orav, C. R. Guttmann, H. L. Weiner, S. J. Khoury e J. P. Antel. Kinin B1 receptor expression on multiple sclerosis mononuclear cells: correlation with magnetic resonance imaging T2-weighted lesion volume and clinical disability. Arch Neurol, v.62, n.5, May, p.795-800. 2005.

Prediger, R. D., R. Medeiros, P. Pandolfo, F. S. Duarte, G. F. Passos, J. B. Pesquero, M. M. Campos, J. B. Calixto e R. N. Takahashi. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience, v.151, n.3, Feb 6, p.631-43. 2008.

Proud, D. e A. P. Kaplan. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. Annu Rev Immunol, v.6, p.49-83. 1988.

Qin, L. J., Y. T. Gu, H. Zhang e Y. X. Xue. Bradykinin-induced blood-tumor barrier opening is mediated by tumor necrosis factor-alpha. Neurosci Lett, v.450, n.2, Jan 30, p.172-5. 2009.

Quintao, N. L., R. Medeiros, A. R. Santos, M. M. Campos e J. B. Calixto. The effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice. Anesth Analg, v.101, n.6, Dec, p.1763-9. 2005.

Quintao, N. L., G. F. Passos, R. Medeiros, A. F. Paszcuk, F. L. Motta, J. B. Pesquero, M. M. Campos e J. B. Calixto. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. J Neurosci, v.28, n.11, Mar 12, p.2856-63. 2008.

Racke, M. K., W. Hu e A. E. Lovett-Racke. PTX cruiser: driving autoimmunity via TLR4. Trends Immunol, v.26, n.6, Jun, p.289-91. 2005.

Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt e F. Sallusto. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. Nat Immunol, v.10, n.5, May, p.514-23. 2009.

Regoli, D. e J. Barabe. Pharmacology of bradykinin and related kinins. Pharmacol Rev, v.32, n.1, Mar, p.1-46. 1980.

Rivera-Quinones, C., D. McGavern, J. D. Schmelzer, S. F. Hunter, P. A. Low e M. Rodriguez. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. Nat Med, v.4, n.2, Feb, p.187-93. 1998.

Rodriguez, M. Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. Brain Pathol, v.17, n.2, Apr, p.219-29. 2007.

Rossi, S., G. Bernardi e D. Centonze. The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol, v.224, n.1, Jul, p.92-102. 2011.

Sarker, M. H., D. E. Hu e P. A. Fraser. Acute effects of bradykinin on cerebral microvascular permeability in the anaesthetized rat. J Physiol, v.528 Pt 1, Oct 1, p.177-87. 2000.

Schreiber, T. H., V. Shinder, D. W. Cain, R. Alon e R. Sackstein. Shear flow-dependent integration of apical and subendothelial chemokines in T-cell transmigration: implications for locomotion and the multistep paradigm. Blood, v.109, n.4, Feb 15, p.1381-6. 2007.

Schrempf, W. e T. Ziemssen. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. Autoimmun Rev, v.6, n.7, Aug, p.469-75. 2007.

Schulze-Toppf, U., A. Prat, T. Prozorovski, V. Siffrin, M. Paterka, J. Herz, I. Bendix, I. Ifergan, I. Schaddock, M. A. Mori, J. Van Horsen, F. Schroter, A. Smorodchenko, M. H. Han, M. Bader, L. Steinman, O. Aktas e F. Zipp. Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system. Nat Med, v.15, n.7, Jul, p.788-93. 2009.

Scolding, N. e R. Franklin. Axon loss in multiple sclerosis. Lancet, v.352, n.9125, Aug 1, p.340-1. 1998.

Sellner, J., J. Kraus, A. Awad, R. Milo, B. Hemmer e O. Stuve. The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis-A critical analysis of potential environmental factors. Autoimmun Rev, v.10, n.8, Jun, p.495-502. 2011.

Sicotte, N. L., S. M. Liva, R. Klutch, P. Pfeiffer, S. Bouvier, S. Odesa, T. C. Wu e R. R. Voskuhl. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. Ann Neurol, v.52, n.4, Oct, p.421-8. 2002.

Simons, M., E. M. Kramer, C. Thiele, W. Stoffel e J. Trotter. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. J Cell Biol, v.151, n.1, Oct 2, p.143-54. 2000.

Sospedra, M. e R. Martin. Immunology of multiple sclerosis. Annu Rev Immunol, v.23, p.683-747. 2005.

Souza, D. G., E. S. Lomez, V. Pinho, J. B. Pesquero, M. Bader, J. L. Pesquero e M. M. Teixeira. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. J Immunol, v.172, n.4, Feb 15, p.2542-8. 2004.

Sriram, S., C. W. Stratton, S. Yao, A. Tharp, L. Ding, J. D. Bannan e W. M. Mitchell. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. Ann Neurol, v.46, n.1, Jul, p.6-14. 1999.

Steranka, L. R., D. C. Manning, C. J. Dehaas, J. W. Ferkany, S. A. Borosky, J. R. Connor, R. J. Vavrek, J. M. Stewart e S. H. Snyder. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.9, May, p.3245-9. 1988.

Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris e J. M. Goverman. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. Nat Med, v.14, n.3, Mar, p.337-42. 2008.

Stromnes, I. M. e J. M. Goverman. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. Nat Protoc, v.1, n.4, p.1810-9. 2006.

Summerday, N. M., S. J. Brown, D. R. Allington e M. P. Rivey. Vitamin D and Multiple Sclerosis: Review of a Possible Association. J Pharm Pract, Oct 10. 2011.

Svendsen, K. B., T. S. Jensen e F. W. Bach. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. Bmj, v.329, n.7460, Jul 31, p.253. 2004.

Svendsen, K. B., T. S. Jensen, K. Overvad, H. J. Hansen, N. Koch-Henriksen e F. W. Bach. Pain in patients with multiple sclerosis: a population-based study. Arch Neurol, v.60, n.8, Aug, p.1089-94. 2003.

Talbot, S., E. Chahmi, J. P. Dias e R. Couture. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. J Neuroinflammation, v.7, n.1, p.36. 2010.

Terenyi, N., N. Nagy, K. Papp, J. Prechl, I. Olah e A. Erdei. Transient decompartmentation of mice delays onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and impairs MOG-specific T cell response and autoantibody production. Mol Immunol, v.47, n.1, Nov, p.57-63. 2009.

Trapp, B. D., J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mork e L. Bo. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med, v.338, n.5, Jan 29, p.278-85. 1998.

Tzartos, J. S., M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri e L. Fugger. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. Am J Pathol, v.172, n.1, Jan, p.146-55. 2008.

Vasko, M. R., W. B. Campbell e K. J. Waite. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. J Neurosci, v.14, n.8, Aug, p.4987-97. 1994.

Von Budingen, H. C., N. Tanuma, P. Villoslada, J. C. Ouallet, S. L. Hauser e C. P. Genain. Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination. J Clin Immunol, v.21, n.3, May, p.155-70. 2001.

Walker, K., M. Perkins e A. Dray. Kinins and kinin receptors in the nervous system. Neurochem Int, v.26, n.1, Jan, p.1-16; discussion 17-26. 1995.

Wandinger, K., W. Jabs, A. Siekhaus, S. Bubel, P. Trillenber, H. Wagner, K. Wessel, H. Kirchner e H. Hennig. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. Neurology, v.55, n.2, Jul 25, p.178-84. 2000.

Waxman, S. G. e J. M. Ritchie. Organization of ion channels in the myelinated nerve fiber. Science, v.228, n.4707, Jun 28, p.1502-7. 1985.

Weiss, N., F. Miller, S. Cazaubon e P. O. Couraud. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. Biochim Biophys Acta, v.1788, n.4, Apr, p.842-57. 2009.

Werner, M. F., C. A. Kassuya, J. Ferreira, A. R. Zampronio, J. B. Calixto e G. A. Rae. Peripheral kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. Neuropharmacology, v.53, n.1, Jul, p.48-57. 2007.

Wingerchuk, D. M., C. F. Lucchinetti e J. H. Noseworthy. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. Lab Invest, v.81, n.3, Mar, p.263-81. 2001.

Wirth, K., G. Breipohl, J. Stechl, J. Knolle, S. Henke e B. Scholkens. DesArg9-D-Arg[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Oic8]bradykinin (desArg10-[Hoe140]) is a potent bradykinin B1 receptor antagonist. Eur J Pharmacol, v.205, n.2, Nov 26, p.217-8. 1991.

Wirth, K., F. J. Hock, U. Albus, W. Linz, H. G. Alpermann, H. Anagnostopoulos, S. Henk, G. Breipohl, W. Konig, J. Knolle e Et Al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. Br J Pharmacol, v.102, n.3, Mar, p.774-7. 1991.

Yamaguchi-Sase, S., I. Hayashi, H. Okamoto, Y. Nara, S. Matsuzaki, S. Hoka e M. Majima. Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. Inflamm Res, v.52, n.4, Apr, p.164-9. 2003.

Yokote, H., S. Miyake, J. L. Croxford, S. Oki, H. Mizusawa e T. Yamamura. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. Am J Pathol, v.173, n.6, Dec, p.1714-23. 2008.

Zajicek, J. P. e V. I. Apostu. Role of cannabinoids in multiple sclerosis. CNS Drugs, v.25, n.3, Mar 1, p.187-201. 2011.

Zhang, H., Y. T. Gu e Y. X. Xue. Bradykinin-induced blood-brain tumor barrier permeability increase is mediated by adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel. Brain Res, v.1144, May 4, p.33-41. 2007.

Zhang, H., D. A. Hilton, C. O. Hanemann e J. Zajicek. Cannabinoid Receptor and N-acyl Phosphatidylethanolamine Phospholipase D-Evidence for Altered Expression in Multiple Sclerosis. Brain Pathol, Jan 19. 2011.



Zhang, M., Y. Mao, S. H. Ramirez, R. F. Tuma e T. Chabrashvili. Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood-brain barrier permeability via oxidative stress. Neuroscience, v.171, n.3, Dec 15, p.852-8. 2010.

Zheng, X., X. Hu, G. Zhou, Z. Lu, W. Qiu, J. Bao e Y. Dai. Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. J Neuroimmunol, v.194, n.1-2, Feb, p.107-14. 2008.

# The Role of Kinin Receptors in Preventing Neuroinflammation and Its Clinical Severity during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice

Rafael C. Dutra<sup>1</sup>, Daniela F. P. Leite<sup>1</sup>, Allisson F. Bento<sup>1</sup>, Marianne N. Manjavachi<sup>1</sup>, Eliziane S. Patrício<sup>1</sup>, Cláudia P. Figueiredo<sup>1</sup>, João B. Pesquero<sup>2</sup>, João B. Calixto<sup>1\*</sup>

**1** Department of Pharmacology, Centre of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, **2** Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

## Abstract

**Background:** Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating and neuroinflammatory disease of the human central nervous system (CNS). The expression of kinins is increased in MS patients, but the underlying mechanisms by which the kinin receptor regulates MS development have not been elucidated.

**Methodology/Principal Findings:** Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced in female C57BL/6 mice by immunization with MOG<sub>35–55</sub> peptide emulsified in complete Freund's adjuvant and injected with pertussis toxin on day 0 and day 2. Here, we report that blockade of the B<sub>1</sub>R in the induction phase of EAE markedly suppressed its progression by interfering with the onset of the immune response. Furthermore, B<sub>1</sub>R antagonist suppressed the production/expression of antigen-specific T<sub>H1</sub> and T<sub>H17</sub> cytokines and transcription factors, both in the periphery and in the CNS. In the chronic phase of EAE, the blockade of B<sub>1</sub>R consistently impaired the clinical progression of EAE. Conversely, administration of the B<sub>1</sub>R agonist in the acute phase of EAE suppressed disease progression and inhibited the increase in permeability of the blood-brain barrier (BBB) and any further CNS inflammation. Of note, blockade of the B<sub>2</sub>R only showed a moderate impact on all of the studied parameters of EAE progression.

**Conclusions/Significance:** Our results strongly suggest that kinin receptors, mainly the B<sub>1</sub>R subtype, play a dual role in EAE progression depending on the phase of treatment through the lymphocytes and glial cell-dependent pathways.

**Citation:** Dutra RC, Leite DFP, Bento AF, Manjavachi MN, Patrício ES, et al. (2011) The Role of Kinin Receptors in Preventing Neuroinflammation and Its Clinical Severity during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. PLoS ONE 6(11): e27875. doi:10.1371/journal.pone.0027875

**Editor:** Robyn Klein, Washington University, United States of America

**Received:** September 26, 2011; **Accepted:** October 27, 2011; **Published:** November 22, 2011

**Copyright:** © 2011 Dutra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX) and the Fundação de Apoio à Pesquisa Científica Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), all of Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. R.C.D., A.F.B., and M.M.N. are Ph.D. students in pharmacology receiving grants from CNPq and CAPES, respectively.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: calixto@farmaco.ufsc.br

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most common inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) that cause neurological disability in young adults, affecting about two million people worldwide [1,2]. The hallmarks of MS include neuronal loss, axonal injury and atrophy of the CNS, due to a progressive inflammatory reaction involving both the adaptive and the innate immune system [3,4,5]. During the course of MS, autoreactive T cells activated in the periphery by viral or infectious antigens, which show molecular similarity to the CNS antigen [6], differentiate into T<sub>H1</sub> or T<sub>H17</sub> cells, migrate across the blood-brain barrier (BBB) and successively induce inflammatory lesions distributed throughout the CNS [2].

The CNS of mammals contains all of the components of the kallikrein-kinin system [7] and accumulating evidence suggests that these components are altered in neurodegenerative processes [8,9,10]. The biological activities of kinin are mediated by two G-protein-coupled receptors, named the B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) and B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R)

receptors. The B<sub>2</sub>R is constitutively expressed throughout central and peripheral tissues, while the B<sub>1</sub>R is normally up-regulated following inflammatory, infectious or traumatic stimuli, exerting a critical role in several chronic diseases [11,12].

Recent reports demonstrated the involvement of the kinins and their receptors in MS and the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model [13,14,15]. For instance, high levels of the kallikrein-kinin components, namely de-Arg<sup>8</sup>-bradykinin (DABK), bradykinin, kallikrein-1 and kallikrein-6, as well as low-molecular-weight kininogens (KNG1), have been found in the CNS tissue and cerebrospinal fluid from both animals with EAE and MS patients [16,17].

Experiments carried out with B<sub>2</sub>R-knockout mice showed that the clinical parameters of MOG<sub>35–55</sub>-induced EAE are reduced via the modulation of leukocyte recruitment into the CNS [14]; however, the participation of B<sub>2</sub>R seems to be less important than B<sub>1</sub>R in the development of EAE [15,17]. It was recently shown that B<sub>1</sub> mRNA expression positively correlated with the expanded disability status scale (EDSS) index and the occurrence of clinical

release in patients with MS [13]. In addition, B<sub>1</sub>R was found to be up-regulated in both the brain endothelial cells [18] and peripheral T lymphocyte cells in these patients [13].

It is widely accepted that, following their activation, both B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R induce inflammation via the release of pro-inflammatory cytokines and increased vascular permeability [11,19]. In marked contrast to this, a recent paper suggested exactly the opposite, i.e. that the activation of B<sub>1</sub>R protects against encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the CNS [17]. For this reason, we hypothesized that kinin receptor, mainly B<sub>1</sub>R subtypes, could display a dual role in EAE by acting at different phases of disease progression. We further examined this hypothesis by using B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>-knockout mice in conjunction with a kinin selective agonist or antagonist at different time points after the induction of EAE.

## Results

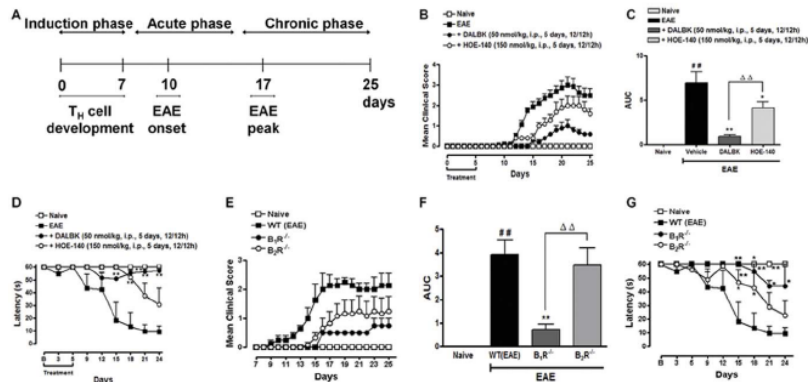
### Dominant role of kinin B<sub>1</sub>R in the induction phase of EAE

Initially, in order to investigate the role of kinin receptors on the EAE induction phase, we induced EAE by subcutaneous injections of MOG<sub>35-55</sub> in complete Freund's adjuvant (CFA), and pertussis toxin injections. By using this protocol, MOG-reactive T cells begin to accumulate in regional lymph nodes on day 7, and mice begin to develop clinical signs between days 10 and 12, with a peak at around day 17 [20]. Therefore, we defined days 0 to 7 as the induction phase, days 7–15 as the acute phase and days 15–25 as the chronic phase of the disease (see scheme in Fig. 1A). Our results showed that the EAE control group developed a first relapse with subsequent chronic disease phase, characterized by manifestation of an ascending paralysis starting from day 13 to day

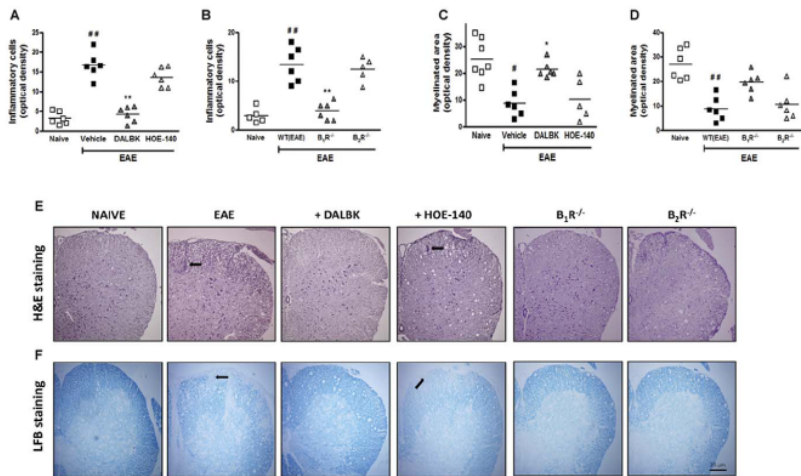
19 following immunization (Fig. 1B–G). Interestingly, in the induction phase of EAE, the blockade of B<sub>1</sub>R by DALBK (50 nmol/kg, i.p., twice a day, days 0–5) significantly reduced disease severity when compared to the EAE control group (Fig. 1B–D). Importantly, the difference in the degree of disease severity persisted until the end of our study at day 25. In line with our findings for the DALBK treatment, the genetic deletion of B<sub>1</sub>R also drastically reduced the clinical score of EAE and delayed the disease onset (Fig. 1E–G). In contrast, preventive treatment with the B<sub>2</sub>R antagonist HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., twice a day, days 0–5) (Fig. 1B–D), or the use of mice with a deletion of B<sub>2</sub>R, only resulted in a moderate inhibition (Fig. 1E–G). These data suggest a dominant role of kinin B<sub>1</sub>R in reducing EAE severity during the induction phase.

### Kinin B<sub>1</sub>R inhibition or its genetic deletion in the disease induction phase decrease the neuroinflammatory response and myelin loss in the spinal cord

The hallmarks of MS include multifocal perivascular T-lymphocytes, macrophages and activated microglia infiltrates in the CNS, which induce oligodendrocyte loss and demyelination [2,21]. In this set of experiments, we assessed the intensity of inflammatory cell infiltrates in the naive group, the control group (EAE), in mice pre-treated with the B<sub>1</sub>R antagonist DALBK (50 nmol/kg), in mice pre-treated with the B<sub>2</sub>R antagonist HOE-140 (150 nmol/kg), as well as in B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice and in B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice after 25 days post-immunization. It was found that the number of inflammatory foci was significantly decreased in B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice and in mice pre-treated with DALBK (*P*<0.01)



**Figure 1. Kinin B<sub>1</sub>R inhibition or deletion in the disease induction phase attenuated the development of EAE and reduced the inflammatory response in the CNS 25 days post-immunization (p.i.).** Animals were immunized with MOG<sub>35-55</sub> peptide/CFA and pertussis toxin. (A) Schematic representation of EAE progression. Day 0 to 7: induction phase; day 7 to 15: acute phase and day 15 to 25: chronic phase of the disease. EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis; T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup> T helper lymphocytes. The clinical score (B, E), area under the curve (AUC) (C, F) and locomotor activity (D, G) were analyzed in the naive group, the control group (EAE), in mice pre-treated with the selective kinin B<sub>1</sub>R antagonist DALBK (50 nmol/kg), in mice pre-treated with the selective kinin B<sub>2</sub>R antagonist HOE-140 (150 nmol/kg), in B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> knockout mice and in B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> knockout mice 25 days p.i. The antagonists were administered intraperitoneally (i.p.), twice a day (12/12 h), for 5 days (day 0–5). The results of clinical score are expressed as mean  $\pm$  SEM of six to nine mice/group and are representative of three independent experiments. \**P*<0.05 and \*\**P*<0.001 versus the naive group, \**P*<0.05 and \*\**P*<0.001 versus the EAE group, <sup>Δ</sup>*P*<0.05 and <sup>ΔΔ</sup>*P*<0.001 versus the DALBK treatment or B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice (one-way ANOVA with the Newmann-Keuls post-hoc test). doi:10.1371/journal.pone.0027875.g001



**Figure 2. Kinin B<sub>1</sub>R inhibition or genetic deletion decreased the level of inflammatory cell infiltration and the demyelination area in experimental EAE.** The lumbar spinal cords were histologically analyzed on day 25 p.i. in the different experimental groups for inflammation by H&E staining (A, B, E) and for demyelination by luxol fast blue staining (C, D, F). The degree of inflammatory infiltrates and demyelination was quantified from an average of four ocular field 5- $\mu$ m sections of lumbar spinal cord white matter transverse sections per mouse for a total of six to nine mice/group in the naive group, the control group (EAE) in mice pre-treated with the B<sub>1</sub>R antagonist DALBK (50 nmol/kg), in mice pre-treated with the B<sub>2</sub>R antagonist HOE-140 (150 nmol/kg), in B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> knockout mice and in B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> knockout mice. Scale bar corresponds to 25  $\mu$ m and applies throughout. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of six to nine mice/group and are representative of three independent experiments. \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.001 versus the naive group, \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.001 versus the EAE group (one-way ANOVA with the Newmann-Keuls post-hoc test). doi:10.1371/journal.pone.0027875.g002

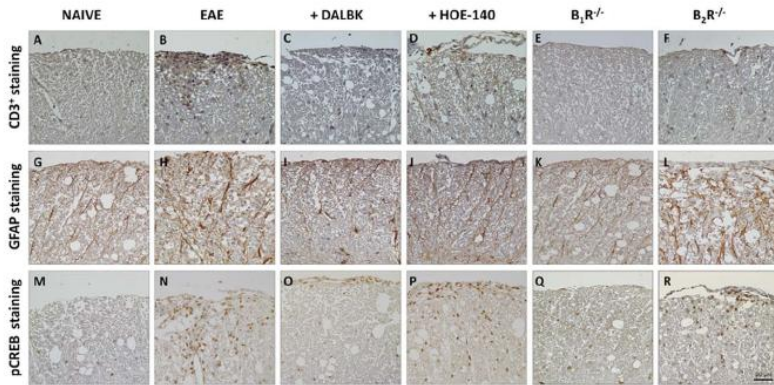
(Fig. 2A, B, E). In order to further evaluate whether or not reduced inflammation in the CNS in the absence of B<sub>1</sub>R could preserve tissue integrity, we investigated the loss of myelin, the number of T lymphocytes and reactive astrogliosis. The demyelination index (Fig. 2C, D, F), number of CD3<sup>+</sup> T cells (Fig. 3A-F) and GFAP immunoreactivity (Fig. 3G-L) were all strikingly reduced when assessed 25 days post-immunization in DALBK-treated animals during induction phase of EAE and in B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice. In contrast, in mice pre-treated with HOE-140 (150 nmol/kg, i.p., days 0-5) and in B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice, these parameters showed no significant changes ( $P$ >0.05) (Fig. 2A-F and Fig. 3A-L). Once again, these data indicate that kinin B<sub>1</sub>R shows a dominant effect on EAE neuroinflammation.

Recent studies also suggested that, at the peak of EAE, the transcription factor cyclic AMP response element-binding protein (CREB) is highly phosphorylated in the spinal cord [22], contributing to the activation of macrophages and microglia, up-regulating the MHC and co-stimulatory molecules [22,23]. Notably, pre-treatment with the B<sub>1</sub>R antagonist (induction phase of EAE) or its genetic deletion resulted in a marked reduction in CREB activation at the lumbar white/grey matter of the spinal cord (Fig. 3M-R), according to the assessment 25 days post-immunization. Pre-treatment with HOE-140 or the genetic deletion of B<sub>2</sub>R also significantly prevented the induction of CREB phosphorylation ( $P$ <0.01) (Fig. 3M-R). However, the blockade of B<sub>2</sub>R did not significantly reduce the demyelination area nor the inflammatory cell infiltrates, suggesting

that CREB phosphorylation by itself is not a limiting event in the recovery of animals with EAE.

#### Blockade of kinin B<sub>1</sub>R in the EAE induction phase limits CD4<sup>+</sup> activation/expansion and effector cytokine production in the peripheral lymphoid tissue

Several pieces of evidence now suggest that the extent of CNS damage in EAE is associated with peripheral T cell activation [5]. We next assessed whether B<sub>1</sub>R or B<sub>2</sub>R exert a role on peripheral lymphocyte activation. Lymph node (LN) obtained from B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice or mice previously treated with B<sub>1</sub>R or B<sub>2</sub>R antagonists were re-stimulated with MOG and analyzed for cytokine production and CD69 expression, a major T cell activation marker. We found a pronounced reduction in TNF- $\alpha$  (Fig. 4A,B), IFN- $\gamma$  (Fig. 4C,D) and IL-17 (Fig. 4E,F) levels produced by MOG-reactive LN cells isolated from mice pre-treated with DALBK and from B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice. In addition, pre-treatment with HOE-140 resulted in a discrete inhibition of TNF- $\alpha$  in LN cells (Fig. 4A,B). Of great relevance, the blockade of B<sub>1</sub>R in the induction phase restored IL-4 levels in LN after *in vitro* re-stimulation with MOG (Fig. 4G,H), suggesting that the inhibition of B<sub>1</sub>R may cause a shift from T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 towards the T<sub>H</sub>2 phenotype. Notably, T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> MOG-reactive cells LN from B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice and from mice pre-treated with DALBK showed a significant reduction in CD69 expression, while



**Figure 3. The blockade of kinin B<sub>1</sub>R in the disease induction phase by pharmacological treatment or genetic deletion ameliorated EAE pathology.** The spinal lumbar cords obtained on the 25<sup>th</sup> day after immunization from the different experimental groups were processed for immunohistochemistry assays: T cell infiltration by CD3 immunoreactivity (A–F); astrocytes activation by GFAP immunoreactivity (G–L); and CREB phosphorylation (M–R). Specifically, four 5- $\mu$ m sections of lumbar spinal cord white matter (six to nine mice/group)  $\approx$  150  $\mu$ m apart were obtained between L4 and L6 from the naive group (A, G and M), the EAE group (B, H and N), from mice pre-treated with the B<sub>1</sub>R antagonist DALBK (50 nmol/kg) (C, I and O), from mice pre-treated with the B<sub>2</sub>R antagonist HOE-140 (150 nmol/kg) (D, J and P) and from mice deficient in B<sub>1</sub>R (E, K and Q) and B<sub>2</sub>R (F, L and R). The antagonists were administered i.p. twice a day (12/12 h), during day 0–5 p.i. Representative sections from three independent experiments are shown. Scale bar corresponds to 25  $\mu$ m and applies throughout.

pre-treatment with HOE-140 only decreased CD69 expression in T CD8<sup>+</sup> cells (Fig. 4 LL).

A recent study demonstrated that CD4<sup>+</sup> T cells are activated in the periphery by the MHC class II<sup>+</sup> APC, which in turn increases the proliferative response and migration to the subarachnoid space, resulting in the formation of large T cell aggregates in the CNS [24]. In order to investigate whether or not B<sub>1</sub>R or B<sub>2</sub>R influences T cell proliferative responses, we evaluated the incorporation of thymidine in lymph node and spleen cells from WT, B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> and B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> immunized mice. In WT animals with EAE, a significant increase was observed in the proliferative response towards MOG<sub>35–55</sub> re-stimulation (Fig. 5 A,C), whereas in splenocytes (Fig. 5 A,B) and lymph node cells (Fig. 5C) from B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice this proliferation was markedly decreased. Taken together, these results suggest that the blockade of B<sub>1</sub>R in the induction phase of EAE modulates the activation and/or differentiation of T<sub>H1</sub> and T<sub>H17</sub>-MOG reactive cells.

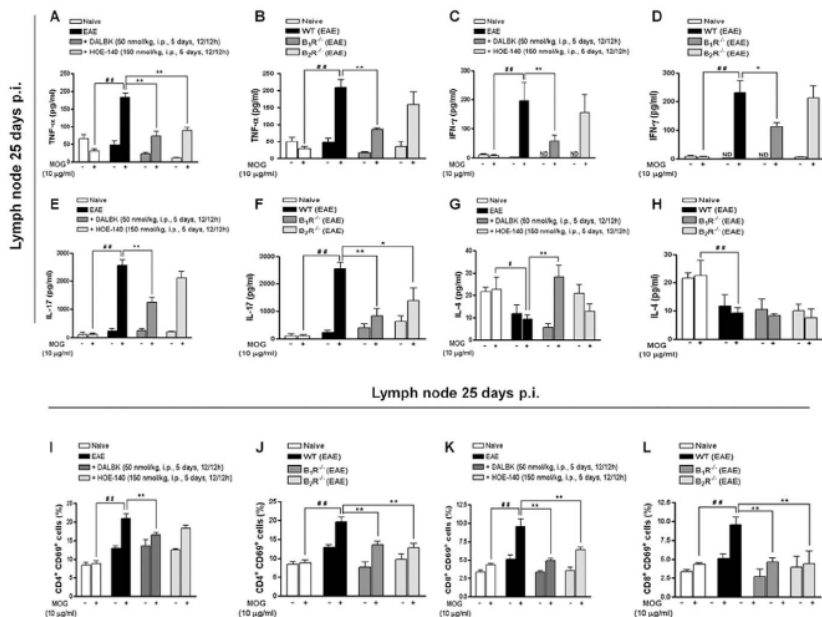
#### Inhibition of B<sub>1</sub>R in the induction phase of EAE suppresses T<sub>H1</sub> and T<sub>H17</sub> autoimmunity in the CNS

Increasing evidence suggest a role for T<sub>H17</sub> and T<sub>H1</sub> in CNS damage, especially the observation of these subpopulations and their signature cytokines in the brains of individuals with MS [25,26,27]. The T<sub>H1</sub> cells are characterized by their expression of IFN- $\gamma$  and its differentiation is orchestrated by the transcription factor T-bet, whereas T<sub>H17</sub> mainly produces IL-17 and the transcription factor involved in its differentiation is the retinoid orphan receptor (ROR- $\gamma$ T) [28]. Therefore, we next investigated whether or not the blockade of B<sub>1</sub>R in the induction phase could reduce the expression of IL-17 (Fig. 5D), ROR- $\gamma$ T (Fig. 5E), TNF- $\alpha$

(Fig. 5F), IFN- $\gamma$  (Fig. 5G) and T-bet (Fig. 5H) in the lumbar spinal cord, 25 days post-immunization. In addition, treatment with DALBK during induction phase of EAE prevented the up-regulation of B<sub>1</sub>R (Fig. 5I).

#### Blockade of B<sub>1</sub>R after disease onset reduces clinical symptoms and neuroinflammation induced by the EAE model

Since MS patients urgently need new and more efficacious therapies to be used after disease outcome, we next investigated whether therapeutic treatment with the B<sub>1</sub>R antagonist DALBK (50 nmol/kg, i.p.) or the B<sub>2</sub>R antagonist HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) might be effective in controlling EAE. The mice were treated for 5 days, twice a day, as soon as clinical signs of the disease appeared (chronic phase: day 15 to day 20 post-immunization). Remarkably, only the therapeutic treatment with DALBK consistently blocked disease progression and motor deficits (Fig. 6 A,B). On day 25, the lumbar spinal cord from animals treated in the chronic phase of EAE with DALBK or HOE-140 showed a significant decrease in levels of cell infiltration (Fig. 6 C,E), demyelination (Fig. 6 D,F), astrocytes (Fig. 6G), microglial activation (Fig. 6H) and CREB phosphorylation (Fig. 6I). In order to further evaluate the loss of spinal cord axons, we assessed the level of neurofilament heavy proteins (NF-H) [29]. In the EAE control group there was a significant loss of axons, while mice treated in the chronic phase of EAE with DALBK (50 nmol/kg, i.p.) or HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) showed a significantly attenuated loss of axons (Fig. 6J). Together, our data suggest that blockade of B<sub>1</sub>R in the CNS showed a dominant role in hampering EAE progression, mainly by affecting the function of astrocytes/microglia, which could lead to neuronal dysfunction.



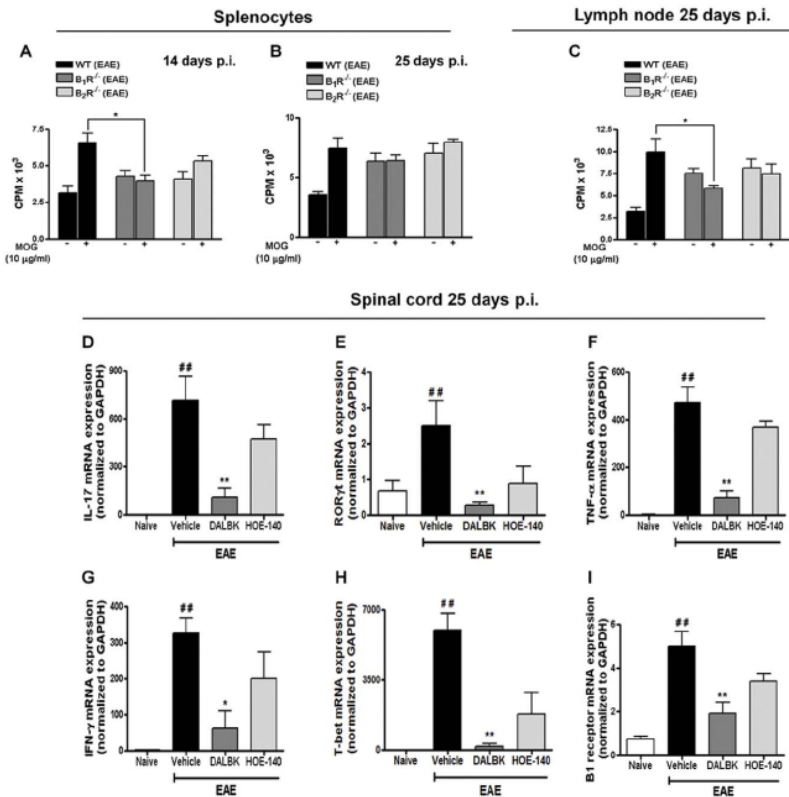
**Figure 4. Kinin B<sub>1</sub>R inhibition or its deletion reduced the production of inflammatory cytokines and the activation of isolated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.** Lymphocytes ( $1 \times 10^7$ /well) obtained 25 days after immunization from the naive group, the control group (EAE), from mice pre-treated with the B<sub>1</sub>R antagonist DALBK (50 nmol/kg), from mice pre-treated with the B<sub>1</sub>R antagonist HOE-140 (50 nmol/kg), from B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice and from B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice were cultured in the presence or absence of MOG<sub>35-55</sub> (10 μg/ml) for 3 days; the supernatants were collected and measured for the concentrations of TNF-α (A, B), IFN-γ (C, D), IL-17 (E, F) and IL-4 (G, H) using ELISA assays. After culture supernatants were collected, the cells were analyzed by flow cytometry for CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (I, J) and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (K, L) T cells. Each column represents the mean ± SEM of six to nine mice per group and is representative of three independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.001 versus the naive group, \*P<0.05, \*\*P<0.001 versus the EAE group (one-way ANOVA with the Newman-Keuls post-hoc test). doi:10.1371/journal.pone.0027875.g004

### The dual role of kinin B<sub>1</sub>R

So far, our data and other recent reports in the literature have demonstrated a protective role of kinin receptor blockade in EAE progression [13,14,15]. However, an unexpected report showed that the activation of B<sub>1</sub>R ameliorates the disease [17]. In order to clarify this discrepancy, we investigated whether or not the B<sub>1</sub>R agonist (DABK) could exert a protective action over EAE throughout the three different stages of the disease (see scheme in Fig. 1A). Treatment with the B<sub>1</sub>R agonist during the induction phase (days 0–5) delayed the onset of clinical signs of EAE by 3 days, as observed previously [17]. However, in our hands the same treatment (DABK, 300 nmol/kg, i.p.) resulted in a severe disease that was similar to the severity of disease observed in the EAE control group (Fig. 7A), and this slight delay did not reach significant difference when calculated based on the area under the curve (Fig. 7B). These results indicate that activation of B<sub>1</sub>R during the EAE induction phase does not improve locomotor activity induced by EAE. This data suggests that in this phase the

best therapeutic strategy is the inhibition of B<sub>1</sub>R (Fig. 7 A,B), which corroborates previous data [15].

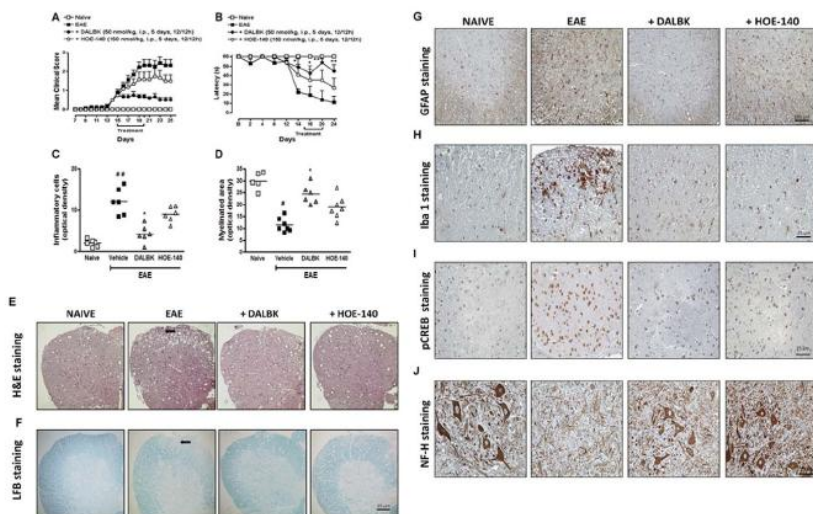
Corroborating and extending previously published data, the treatment of animals with the selective B<sub>1</sub>R agonist DABK (300 nmol/kg, i.p.) from day 7 to 17 (acute phase) strikingly inhibited EAE progression (Fig. 7 C,D), whereas the B<sub>1</sub> antagonist DALBK (50 nmol/kg, i.p.) did not alter the course of the disease (Fig. 7 C,D). Herein, in order to elucidate this peculiar data, we considered which process would be more likely to happen in the acute phase of the disease. A pivotal step in triggering CNS inflammation is disruption of the blood-brain barrier (BBB) [30]. In order to investigate whether the activation of B<sub>1</sub>R in the acute phase influenced BBB permeability and neuroinflammation, we used the Evan's blue assay and T<sub>H1</sub>- and T<sub>H17</sub>-cytokine expression in the lumbar spinal cord, respectively. On day 21 after immunization, the EAE group showed a significant increase in Evan's blue extravasations, demonstrating the disruption of BBB permeability (Fig. 7E). Interestingly, the B<sub>1</sub>R agonist DABK



**Figure 5.** B<sub>1</sub>R inhibition affects the peripheral and central MOG-specific immune responses during EAE pathology. Splenocytes (A, B) and drained lymph node (C) were isolated from immunized mice (EAE group) and B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> and B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice on days 14 and 25 p.i. The cells (1 × 10<sup>6</sup>/well) were cultured in the presence or absence of MOG<sub>35-55</sub> (10 μg/ml) for 72 h to assess proliferation by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation. Total RNA was extracted from the lumbar spinal cord of mice in the naive group, the control group (EAE), DALBK (50 nmol/kg) mice, HOE-140 (50 nmol/kg) mice, B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice and B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice on day 25 p.i. The mRNA levels of IL-17 (D), ROR $\gamma$ T (E), TNF- $\alpha$  (F), IFN- $\gamma$  (G), T-bet (H) and B<sub>1</sub>R (I) were measured. GAPDH mRNA was used to normalize the relative amounts of mRNA. The data are presented as mean  $\pm$  SEM of six to nine mice/group and are representative of three independent experiments. \*P < 0.05, \*\*P < 0.001 versus the naive group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.001 versus the EAE group (one-way ANOVA with the Newmann-Keuls post-hoc test). doi:10.1371/journal.pone.0027875.g005

(300 nmol/kg, i.p.) markedly reduced Evan's blue extravasations in the spinal cord, whereas the blockade of B<sub>1</sub>R with DALBK induced an increase in the BBB permeability (Fig. 7E). In addition, in the acute phase of EAE, DABK treatment (300 nmol/kg, i.p.) significantly reduced IL-17 (Fig. 7F), IFN- $\gamma$  (Fig. 7G) and TNF- $\alpha$  (Fig. 7H) mRNA in the spinal cord on day 21. Of note, therapeutic treatment with the B<sub>1</sub>R agonist DABK (300 nmol/kg, i.p.) during the chronic phase of EAE (day 15 to 20) failed to inhibit the

clinical score (Fig. 7 I, J) and locomotor deficits (data not shown) induced by EAE. The study of this disease stage has huge importance since therapies applied after disease outcomes are mostly clinically relevant. Our work solved many conflicting data in the literature and indicates that in the chronic phase of EAE the best therapeutic option would be the blockade of B<sub>1</sub>R. Taken together, these results suggest that, in the acute phase of immunization, the kinin B<sub>1</sub> agonist (DABK, 300 nmol/kg, i.p.)



**Figure 6. Blockade of kinin B<sub>1</sub>R in the chronic disease phase decreased the clinical symptoms and neuroinflammation in the EAE model.** The clinical score (A) and locomotor activity (B) were analyzed 25 days after the animals were immunized with MOG<sub>35-55</sub> peptide/CFA. The inflammatory infiltrates (H&E staining; C, E), demyelination area (LFB staining; D, F), immunoreactivity of GFAP (G), Iba-1 (H), phospho-CREB (I) and neurofilament-H (J) were analyzed 25 days p.i. in the lumbar spinal cords of mice in the naive group, the control group (EAE) and in mice treated in the chronic phase (days 15–20) with B<sub>1</sub>R (DALBK, 50 nmol/kg, i.p.) or B<sub>2</sub>R (HOE-140, 150 nmol/kg, i.p.) antagonists. Specifically, four alternate 5- $\mu$ m sections (six to nine animals/group) of the white matter (E–I) and grey matter (J) of the lumbar spinal cord were obtained between L4–L5. Scale bar corresponds to 25  $\mu$ m and applies throughout. The data are presented as mean  $\pm$  SEM of six to nine mice/group and are representative of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  versus the naive group, \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.001$  versus the EAE group (one-way ANOVA with the Newmann-Keuls post-hoc test). doi:10.1371/journal.pone.0027875.g006

inhibits disruption of the BBB permeability, prevents the entry of both T<sub>H</sub>17 and T<sub>H</sub>1 cells into the CNS and consequently suppresses neuroinflammation. Unlike in the induction and chronic phases, in the acute phase B<sub>1</sub>R activation positively regulates EAE progression, suggesting a dual role of this receptor at different time points of EAE progression.

## Discussion

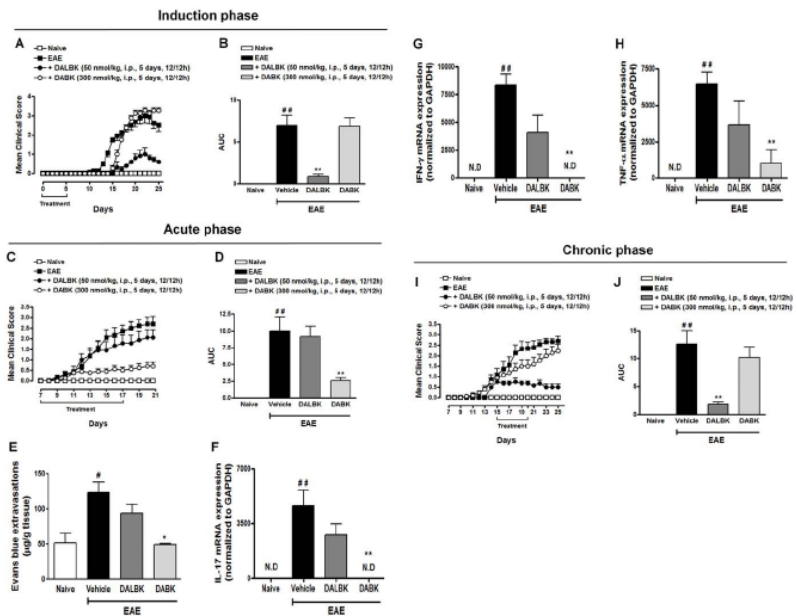
The main results to emerge from the present study are, to the best of our knowledge, the first pieces of evidence to show that the blockade of kinin B<sub>1</sub>R, and, to a lesser extent, the B<sub>2</sub>R subtype, either in the EAE induction or chronic phase, prevented disease progression by modulating the onset of the immune response and by affecting the functioning of astrocytes/microglia cells, respectively. However, we also found that the systemic administration of the B<sub>1</sub> agonist but not the antagonist, given in the acute phase of the disease, markedly reduced disease severity and inhibited the increase in BBB permeability, blocking neuroinflammation. Our last findings confirm and also extend previous data which indicated that the activation of B<sub>1</sub>R can ameliorate EAE severity by controlling the migration of pro-inflammatory T cells across the BBB into the CNS [17]. Our data provide what we believe is new evidence to demonstrate that, depending on the phase of

treatment, either a selective B<sub>1</sub> agonist or a selective B<sub>1</sub> antagonist is able to block EAE progression through different mechanisms (see proposed scheme in Fig. 8).

Furthermore, both the genetic and pharmacological data presented in this study showed that blockade of the B<sub>2</sub>R-modulated activation of T CD4<sup>+</sup> and, particularly, CD8<sup>+</sup> MOG-reactive cells in the peripheral lymphoid tissue decreased CREB phosphorylation in the spinal cord, decreased neuropathic pain and also attenuated the loss of axons in the CNS. These findings largely extend those of a previous study which indicated that B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice showed a reduction in the clinical parameters of MOG-induced EAE through the modulation of leukocyte recruitment into the CNS [14]. Nonetheless, unlike with B<sub>1</sub>R, B<sub>2</sub>R inhibition was not able to significantly reduce the size of the demyelination area, nor the central inflammatory cell infiltration, justifying the moderate impact found for all of the parameters of EAE progression studied. These results confirmed the dominant role of B<sub>1</sub>R in the development of EAE [15,17].

Indeed, it is widely accepted that the activation of both B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R positively contribute to pain generation and inflammation [11]. Besides this, many studies imply the involvement of the kallikrein-kinin system in MS and the EAE model [13,14,15]. Nonetheless two recent studies using MOG-induced EAE presented contradictory



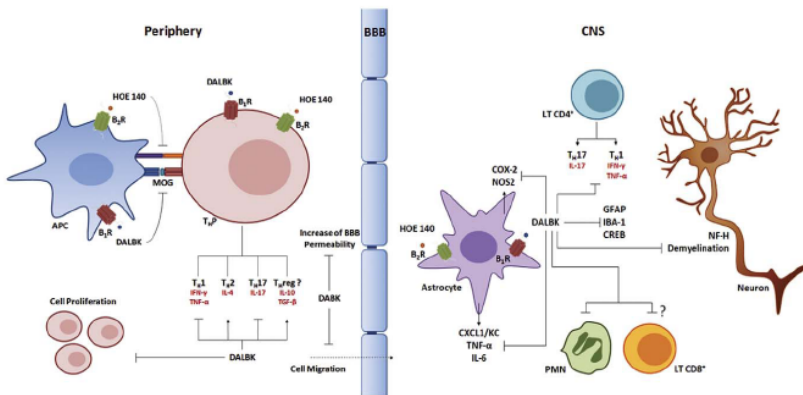


**Figure 7. Activation of kinin B<sub>1</sub>R in the acute disease phase improved the pathology of EAE.** The clinical score (A, C and I) and area under the curve (AUC) (B, D and J) were analyzed in the induction (day 0–5), acute (day 7–17) and chronic (day 15–20) phases of EAE, respectively. The animals were separated into different groups: naive group, EAE group, mice treated with the B<sub>1</sub>R agonist DALBK (300 nmol/kg, i.p.) and mice treated with the B<sub>1</sub>R antagonist DALBK (50 nmol/kg, i.p.). The agonists/antagonists were administered intraperitoneally (i.p.), twice a day (12/12 h), during different time-points of EAE. In the acute phase of EAE, the pharmacological activation of B<sub>1</sub>R (DALBK treatment: 300 nmol/kg, i.p.) significantly decreased Evan's blue extravasations in the spinal cord on day 21 compared to the EAE control group (E) and the mRNA levels of IL-17 (F), IFN- $\gamma$  (G) and TNF- $\alpha$  (H), as measured by RT-PCR. The GAPDH mRNA was used as an endogenous control in the RT-PCR assay. The data are presented as mean  $\pm$  SEM of six to nine mice/group and are representative of four independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  versus the naive group, \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.001$  versus the EAE-treated group (one-way ANOVA with the Newmann-Keuls post-hoc test). N.D. not detected. doi:10.1371/journal.pone.0027875.g007

results; i.e., Gobel and collaborators showed that mice with the deletion of B<sub>1</sub>R presented a significantly reduced disease severity compared to the EAE control group, whereas Schulze-Toppoff and colleagues demonstrated a greater clinical disease severity in these animals. The discrepancies between our findings and those reported by Schulze-Toppoff et al. could be explained by certain genetic differences and the method of maintenance of our B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mutant mice, as well as by the gene-environment risk factor. Schulze-Toppoff et al. used B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice after they were backcrossed to C57BL/6 to produce F<sub>10</sub> offspring with a SV129 background. Our B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> knockout animals were obtained by the same way, although after the F<sub>10</sub> offspring we maintained the mutant line by crossing them with each other. A necessary caveat with this design is that time, isolation and constant generations among homozygous mutants increase the risk of *de novo* mutations, which could lead to biasing genetic difference between the congenics, the parental recipient strain, and, particularly, the F<sub>10</sub>

offspring breed mutant, which can often characterize an inbred substrain [31,32,33]. In addition, some gene-by-environment risk factors may be responsible for the appearance of phenotypic differences between similar strains [34,35,36]. Another relevant point is that our animals were immunized twice with MOG on days 0 and 7 in order to increase the incidence of EAE, as previously described (24). However whether the double MOG immunization could have induced some degree of tolerance in our B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice needs to be further investigated. Here, we hypothesize that this apparent discrepancy could reside in the unusual role played by B<sub>1</sub>R throughout the different phases of EAE progression. We further examined this hypothesis by using a kinin agonist or antagonist at different time points of EAE progression.

Accumulated evidence now suggests that in the induction phase of EAE and MS disease T cells in the periphery become activated by a viral or another infectious antigen [6]. Herein, we show that blockade of kinin B<sub>1</sub>R in the induction phase of EAE consistently



**Figure 8. Schematic representation of the mechanism via which kinin regulates the physiopathology of the EAE model.** The blockade of kinin B<sub>1</sub>R in either the induction or the chronic phase of EAE suppressed disease progression with the concomitant suppression of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17-myelin-specific cell development in at least two different stages: (1) during onset of the peripheral immune response, through the modulation of differentiation and/or expansion of auto-aggressive T<sub>H</sub> cells in the MOG<sub>33–55</sub>-specific immune responses; and (2) during neuroinflammation by affecting the auto-aggressive function of T cells and astrocytes. However, the blockade of B<sub>1</sub>R in the acute phase of EAE only had a slight effect, whereas that of the B<sub>2</sub> agonist also given at this time markedly reduced disease severity through the inhibition of increased BBB permeability and cell migration, and consequently blocked CNS inflammation. Altogether, we found that kinins, especially B<sub>1</sub>R subtypes, have a dual role during the progression of EAE by distinct mechanisms of action at each stage of disease progression. APC: antigen-presenting cell; DALBK: des-Arg<sup>1</sup>-[Leu<sup>1</sup>]-BK; HOE-140: D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>]-Thi<sup>5</sup>-D-Tic<sup>7</sup>-Oic<sup>8</sup>-BK; DABK: des-Arg<sup>1</sup>-BK; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; B<sub>1</sub>R: kinin B<sub>1</sub> receptor; B<sub>2</sub>R: kinin B<sub>2</sub> receptor; T<sub>H</sub>P: precursor T cell; BBB: blood-brain barrier; CXCL1/KC: keratinocyte-derived chemokine; TNF- $\alpha$ : tumour necrosis factor- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TGF- $\beta$ : transforming growth factor beta; PMN: polymorphonuclear leukocytes; GFAP: glial fibrillary acidic protein; Iba1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; CREB: cAMP response element-binding; NF-H: neurofilament-H. (—), inhibition; (→), stimulation. doi:10.1371/journal.pone.0027875.g008

inhibited onset of the immune response by modulating the activation of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17-MOG reactive cells during the presentation of myelin antigens in peripheral lymphoid organs. Consequently, these cells failed to differentiate, proliferate and migrate to the CNS effectively, an effect that abrogated the development of EAE. In fact, our data extends the results of recent reports which indicated that modulation of the microenvironment during antigen presentation and cell activation altered the immune response and then the course of the disease, mainly by diminishing the response of MOG-specific T cells [37,38,39]. In agreement with our data, Aliberti et al. showed that kinin can serve as a danger signal that triggers dendritic cell activation, driving T cell polarization, which means that kinins can modulate the immune response at the very beginning of the disease [40].

Another interesting aspect investigated in the present study was the fact that after peripheral activation, CD4<sup>+</sup> T cells effectively migrated to the CNS during the acute phase of EAE. Here, we found that in the acute phase of EAE, the blockade of B<sub>1</sub>R occurred after the presentation of antigens in peripheral lymphoid organs and, at the same time, treatment of animals with the B<sub>1</sub> antagonist had no effect. In marked contrast, the activation of B<sub>1</sub>R, assessed via treatment with the B<sub>1</sub> agonist DABK, inhibited the progression of EAE and neuroinflammation by modulating the permeability of the BBB, a pivotal step that triggers CNS inflammation, an event which is directly related to the development of MS [30,41]. A recent report showed that in the passive induction of EAE, activation of B<sub>1</sub>R with the agonist R838 (day 0–10) after the adoptive transfer of

proteolipid protein (PLP)<sub>139–151</sub>-reactive lymphocytes significantly reduced clinical disease severity when compared with the EAE-control group [17]. Interestingly, it is worth highlighting the fact that the period of treatment of animals in this previous work using the passive induction protocol (day 0 to day 10 after transfer) [17] can be compared with our acute phase of EAE (day 7–17) after the active induction protocol, since the immune response had been already triggered. During the above mentioned period it is possible to evaluate initiation of the myelin-reactive immune attack, as well as T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 cell migration to the CNS [42]. Based on these results, it is tempting to suggest that activation of B<sub>1</sub>R in the acute phase of EAE seems to affect CNS inflammation and control the migration of pro-inflammatory T cells across the BBB into the CNS, as previously described [17].

Recent data from the literature have shown that bradykinin (BK), a preferential B<sub>2</sub>R agonist, is able to selectively open the BBB, since BK accelerate the release of TNF- $\alpha$  [43,44]. Of note, in animal models, B<sub>2</sub>R agonist like Cereport<sup>®</sup> (RMP-7) has been used by the intracarotid route in order to increase the BBB permeability and consequently enhance the delivery of chemotherapeutic agents to the brain tumor area [45,46,47]. More recently, a very interesting study conducted by Liu et al. demonstrated that BK increases the BBB permeability by down-regulating the expression levels of tight junction [TJ]-associated proteins, such as zonula occludens-1 (ZO-1), occludin, and claudin-5 and rearranging cytoskeleton protein filamentous actin (F-actin) [48]. However, additional studies are needed to assess the precise mechanisms by

which BK modulate the BBB permeability during neuroinflammation conditions, such as MS.

Concerning the chronic phase of EAE, it has been reported that CD4<sup>+</sup> T cells enter the subarachnoid space by crossing the blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier in either the choroid plexus or in the meningeal venules, and they are re-activated by MHC class II-expressing macrophages/microglia and DCs. Afterwards, macrophage and glial cells secrete soluble mediators that trigger demyelination and attract further inflammatory cells into the CNS [5]. Of note, our data revealed that the blockade of B<sub>1</sub>R in the chronic phase of EAE consistently improved the clinical signs and neuroinflammation induced by EAE. Moreover, *in vitro* pre-treatment with the B<sub>1</sub>R antagonist (DALBK) blocked the pro-inflammatory release/expression induced by IFN- $\gamma$  in primary astrocytes cultures (data not shown). At this same point in time, due to the peptide nature of these antagonists, it is highly unlikely that, given systemically, they could cross the BBB in opposite directions to block central kinin B<sub>1</sub>R or B<sub>2</sub>R. However, several studies suggested that when under neuroinflammatory conditions, the activation or damage of cellular components of the BBB could facilitate leukocyte infiltration leading to oligodendrocyte death, axonal damage, demyelination and lesion development [30]. Likewise, a recent report showed that B<sub>1</sub>R antagonist (R715) treatment, which started once the animals were already displaying the first clinical symptoms of EAE (chronic phase), markedly inhibited the EAE score [15]. Therefore, we can suggest that after disruption of the BBB in the chronic phase of EAE, the kinin B<sub>1</sub>R antagonists most likely penetrate the CNS and mainly hamper EAE progression by affecting the functioning of astrocytes cells.

Altogether, the present study identified B<sub>1</sub>R as a key mediator in EAE disease and suggested that kinin B<sub>1</sub>R displays a dual role in the progression of EAE via distinct mechanisms at each stage of the disease, mainly through the modulation of T<sub>H1</sub> and T<sub>H17</sub>-myelin-specific lymphocytes and glial cell-dependent pathways (Fig. 8). Our findings open up important options for the development of clinically relevant therapies for the management of MS, as well as for other immune diseases in which T<sub>H1</sub> and T<sub>H17</sub> cells play a key role.

## Materials and Methods

### Experimental animals

The experiments were conducted using female C57BL/6, kinin B<sub>1</sub>R-knockout (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) and kinin B<sub>2</sub>R-knockout (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) mice (6–10 weeks old). The B<sub>1</sub>R gene was cloned from a genomic library of 129/SvJ mice in  $\lambda$ HXII [49]. The targeting vector was generated by flanking the neomycin resistance gene with a 1.0-kb genomic 5' fragment of the B<sub>1</sub>-coding region and a 7.0-kb 3' fragment of the B1-coding region. The construct was linearized with NotI and transfected into E14–1 embryonic stem cells by electroporation as previously described [50]. Gancyclovir- and G418-resistant clones were selected and identified by polymerase chain reaction (PCR). Two positive clones were microinjected into C57BL/6 blastocysts, which gave rise to two germ-line chimeras with offspring that were heterozygous for the targeted mutation. The generation of B<sub>2</sub>R mice and gene targeting was performed in the embryonic stem (ES) cell line AB 2.1, derived from 129/SvJ mice [51]. The mouse genomic DNA utilized to construct the targeting vector was obtained from a cosmid clone isolated from a library constructed by Dr John Mudgett (Merk Research Laboratory, Rahway, NJ) from an ES cell line, J1, derived from 129/SvJ mice. The ES cell clones containing the targeted disruption of the B<sub>2</sub>R gene were separated from SNL feeder cells by treating the cell culture with trypsin, allowing the feeder cells to reattach for

30–45 min, and removing the unattached ES cells. Two B<sub>2</sub>R-targeted ES clones, KO-5 and KO-24, were injected into recipient C57BL/6 3-day-old blastocysts; following this, they were reimplanted into day 3 pseudo-pregnant Tac:SW(JBR) mice and allowed to develop to term. The B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> and B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> mice used in the experiments originated from ten generations of backcrossing of mice with an initially mixed genetic background (129/SvJ and C57BL/6) with C57BL/6 mice (Taconic, Germantown, NY). Following the F<sub>10</sub> offspring the line is 99% genetically identical to the recipient strain (C57BL/6) and is considered congenic with it; we maintained this lineage by crossing them with each other. The C57BL/6 animals were used as controls. The mice were kept in groups of six to nine animals per cage, maintained under controlled temperature (22 $\pm$ 1°C) and humidity (60–80%) conditions with a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and were given free access to food and water. All procedures used in the present study followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 85-23) and were approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC, protocol number 23080038266/2008-43).

### Drug treatment protocol

The following series of experiments were designed to evaluate how kinin receptors regulate some of the biological processes that occur in the EAE model. (1) In order to determine the effect of the kinin receptor on the origin of the autoimmune response induced by EAE (Induction phase), different groups of animals were treated with the selective B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R antagonists and/or agonists twice a day, for 5 days (starting on day 0 until day 5 post-immunization). (2) In order to assess the ability of kinin B<sub>1</sub>R to modulate the development of neuroinflammation induced by EAE (Acute phase), the animals were treated for 10 days (starting on day 7 until day 17 post-immunization). (3) In order to evaluate the effect of B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R after the clinical signs of EAE had already been observed (Chronic phase), the animals were treated for 5 days as soon as the first clinical signs appeared (from day 15 to 20 post-immunization). The B<sub>1</sub>R antagonist Des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>5</sup>]-BK (DALBK, 50 nmol/kg), the B<sub>1</sub>R agonist Des-Arg<sup>9</sup>-BK (DABK, 300 nmol/kg) or the B<sub>2</sub>R antagonist HOE-140 (HOE, 150 nmol/kg), or their vehicles, were administered intraperitoneally (i.p.) The choice of the dose for each drug was based on pilot experiments (data not shown) or on data previously described in the literature [8,52].

### EAE induction

The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced by subcutaneous (s.c.) immunization into the flanks with 200  $\mu$ l of an emulsion containing 200  $\mu$ g of MOG<sub>35–55</sub> peptide and 500  $\mu$ g of *Mycobacterium tuberculosis* extract H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) in incomplete Freund's adjuvant oil (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). This procedure was repeated after 7 days in order to increase the incidence of EAE, as previously described [42]. In addition, the animals received 300 ng of pertussis toxin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) i.p. on day 0 and on day 2 post-immunization. Non-immunized (naive) and EAE-group animals were used as the control groups. The animals were monitored daily and neurological impairment was quantified using a clinical scale after day 7 post-immunization [42]. Mice were weighed and observed daily for clinical signs of EAE for up to 25 days post-immunization. Clinical signs of EAE were assessed according to the following scores: 0, no signs of disease; 1 loss of tone in the tail; 2 hindlimb

paralysis; 3 hindlimb paralysis; 4 tetraplegia; 5 moribund and/or death.

#### Behavioural experiments

**Rotarod test.** As a test of locomotor activity and coordination, the mice were placed on a rotarod apparatus at a fixed rotational speed of 4 rpm. The maximum time for each trial was set at 60 s. Rotarod training was performed prior to disease induction and consisted of three consecutive trials in which the animals became familiar with the task. After disease induction, the mice were tested every two days, until day 25 post-immunization.

#### Measurement of cytokine production in lymph node (LN) and spleen cells

Inguinal LN cells and splenocytes from the mice were prepared on day 25 after immunization. Briefly, lymph nodes and the spleen were individually macerated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum, HEPES (20 nM), 2-mercapto ethanol, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) and the cell suspension was filtered through a 70 µm filter. The resulting suspension was centrifuged at 1500 *g* for 7 min at 4°C. For the spleen tissue, after the initial centrifugation the supernatant was discarded and the cell pellet resuspended in ammonium chloride potassium carbonate buffer (ACK lysis buffer) using 1 ml per donor mouse to lyse red blood cells and incubated on ice for 5 min. After incubation, 9 ml of the medium was added to stop the cell lysis. The cell debris was allowed to settle on the bottom of the tube for 2 min before being transferred to a new 15 ml conical tube and centrifuged for 5 min at 500 *g* and 4°C. Finally, the supernatant was discarded and the cells were resuspended in 2 ml of the medium. Lymph node cells and splenocytes ( $1 \times 10^6$ /well) were cultured in the presence of MOG<sub>35-55</sub> (10 µg/ml) or in the medium alone. The LN cells and splenocytes were incubated for 48 h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The culture supernatants were collected and stored at -70°C until further analysis. The levels of tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-17 (IL-17) and interleukin-4 (IL-4) were measured using ELISA kits, according to the manufacturer's recommendations. After collection of the culture supernatants, the cells were used in a flow cytometry assay.

#### Proliferation assays

Lymph node and spleen cells ( $1 \times 10^6$ /well) prepared from immunized mice (EAE control group) and kinin B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R-knockout mice were cultured in 96-well flat-bottomed microculture plates in the presence of MOG<sub>35-55</sub> (10 µg/ml) or in medium alone. After 60 h, 0.5 µCi per well [<sup>3</sup>H] thymidine was added to each well and then incubated for 12 h. The cells were then harvested onto glass fibre filters, and radioactivity was measured in a Liquid Scintillation/Beta Counter LS5000TD (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

#### Flow cytometric analysis of lymphocytes

After incubation with MOG<sub>35-55</sub>, the LN cells were washed with RPMI 1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum and further incubated with the following antibodies for 20 min at 4°C: anti-CD4-PerCP (clone RM4-5, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), anti-CD8a-APC (clone 5H10, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) and anti-CD69-PE (clone H1.2F3, BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA). The data were collected using FACSCanto II (BD Biosciences) and analysed using FlowJo (version 7.5) software.

#### Histological analysis

Twenty-five days after the induction of EAE, the mice were deeply anesthetized with 7% chloral hydrate (8 ml/kg; i.p.) and intracardially perfused with 4% of the paraformaldehyde fixative solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The spinal cords were removed and post-fixed for 24 h in the same solution, and then embedded in paraffin after dehydration and diaphanization. The histological analysis of inflammation and demyelination was performed using haematoxylin-eosin (H&E) and luxol fast blue (LFB), respectively. The settings used for image acquisition were identical for both control and experimental tissues. Four ocular fields per section (six to nine mice per group) were captured and a threshold optical density that best discriminated the nuclear staining of inflammatory cells (haematoxylin-eosin) or myelin (luxol fast blue) was obtained using the NIH ImageJ 1.36b imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA) and applied to all experimental groups. The total pixel intensity was determined, and the data are expressed as optical density (O.D.).

#### Immunohistochemistry assay

Immunohistochemical analysis was performed on paraffin-embedded lumbar spinal cord tissue sections (5 µm) using monoclonal mouse anti-CD3<sup>+</sup> T cells (1:100), monoclonal mouse anti-GFAP (1:300), polyclonal goat anti-Iba-1 (1:200), monoclonal mouse anti-neurofilament H (1:200) and polyclonal rabbit anti-phospho-CREB (1:300), according to the method previously described [53]. After quenching of endogenous peroxidase with 1.5% hydrogen peroxide in methanol (v/v) for 20 min, high-temperature antigen retrieval was performed by immersing the slides in a water bath at 95 to 98°C in 10 mmol/l trisodium citrate buffer, pH 6.0, for 45 min. The slides were then processed using the Vectastain Elite ABC reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA), according to the manufacturer's instructions. Following this the immune complexes were visualized with (0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) plus 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (for exactly 1 min). The reaction was stopped by thorough washing in water and counterstained with Harris's haematoxylin. Besides staining untreated animals as negative controls, sections were also incubated without the primary antibody (data not shown), and these controls resulted in little or no staining. To eliminate temporal variations, control and experimental tissues were placed on the same slide and processed under the same conditions. Images were acquired using a Sight DS-5M-L1 digital camera connected to an Eclipse 50i light microscope (both from Nikon, Melville, NY, USA). Specifically, four alternate 5-µm sections of the lumbar spinal cord with an individual distance of 150 µm were obtained between L4 and L6. Images of stained white matter of the spinal cord were acquired using a Sight DS-5M-L1 digital camera (Nikon, Melville, NY, USA) connected to an Eclipse 50i light microscope (Nikon). For the NF-H analysis, images of the grey matter of the lumbar spinal cord (dorsal and ventral horns) were obtained. The optical density threshold that best discriminated staining from the background was selected using the "Threshold Color" plug of NIH ImageJ 1.36b imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA) and applied to all experimental groups. For phospho-CREB, GFAP, Iba-1 and NF-H analyses, the total pixel intensity was determined and the data were expressed as optical density (O.D.). In order to analyse the number of T lymphocyte cells, CD3-positive cells were visually inspected by counting the number of labelled cells in the white matter of the lumbar spinal cord section, using a counting grid at a  $\times 400$  magnification.

#### Real-time quantitative PCR

Lumbar spinal cord (six to nine animals/group) tissues were removed 25 days post-immunization and the total RNA was

extracted using the Trizol protocol. The reverse transcription assay was carried out as described in the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR analysis of mRNA was performed in StepOnePlus™ using the TaqMan® Universal PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for quantification of the amplicons, and 100 ng of cDNA were used in each reaction. The cDNA was amplified in triplicate using specific TaqMan Gene Expression target genes, the 3' quencher MGB and FAM-labelled probes for TNF- $\alpha$  (Mm00443259\_m1), IFN- $\gamma$  (Mm9999071\_m1), interleukin-17 (IL-17) (Mm00439618\_m1), kinin B<sub>1</sub>R (Mm00432059\_s1), ROR- $\gamma$ T (Mm0041144\_g1), T-bet (Mm00450960\_m1) and GAPDH (NM\_000884.2), which were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). The thermocycler parameters were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 50 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Samples without cDNA were analysed as "no template" controls. The mRNA levels were quantified using the comparative threshold cycle (Ct) method [54], where the mean Ct values from duplicate measurements were used to calculate the expression of the target gene, with normalization to the housekeeping gene GAPDH in the samples.

#### Measurement of BBB permeability

The BBB permeability was assessed by measuring the extravasations of Evan's blue (EB) dye, as previously described [55]. Briefly, on day 21, the mice were i.v. injected with 0.1 ml 2% EB, which was allowed to circulate for 60 min. Following this period of circulation, the animals were transcardially perfused with 0.9% phosphate buffered saline (PBS) to remove the intravascular EB dye. The lumbar spinal cord (L4-L6) was further dissected and weighed. Tissue was incubated in 600  $\mu$ l formamide at 60°C for 24 h. At the end of incubation, the tissues were removed and the formamide solution was centrifuged at 20,000 g for 20 min. The supernatant solution was collected and the optical density was measured at 620 nm to determine the relative amount of EB dye in each sample.

#### Materials

Pertussis toxin, PBS, H&E, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Incomplete Freund's adjuvant oil, kinin B<sub>1</sub>R antagonist des-Arg<sup>9</sup>-(Leu<sup>9</sup>)-BK, kinin B<sub>1</sub>R agonist des-Arg<sup>9</sup>-BK, HEPES, penicillin, streptomycin, Na-EDTA, trypsin, deoxyribonuclease I (DNase) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The kinin B<sub>2</sub>R antagonist HOE-140 was donated by Aventis (Frankfurt

Main, Germany). Formaldehyde, formamide, NH<sub>4</sub>Cl and KHCO<sub>3</sub> were obtained from Merck (Frankfurt, Darmstadt, Germany). The MOG<sub>35-55</sub> peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) was obtained from EZBioLab, Carmel, IN 46032, USA; and *M. tuberculosis* extract H37Ra from Difco Laboratories, Detroit, MI, USA. The RPMI 1640 and fetal bovine serum were purchased from GIBCO (Carlsbad, CA, USA). [<sup>3</sup>H] Thymidine (0.5 mCi/ml) was provided by Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). The anti-mouse-TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-4 DuoSet kits were obtained from R&D Systems. The monoclonal mouse anti-CD3<sup>+</sup> T cells were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and the polyclonal goat anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). The monoclonal mouse anti-astrocytes marker glial fibrillary acidic protein (GFAP), monoclonal mouse anti-neurofilament H (NF-H) and polyclonal rabbit anti-nuclear phospho-cyclic AMP response element binding protein (CREB) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Secondary antibody Envision Plus, streptavidin-HRP reagent and 3,3'-diaminobenzidine chromogen were purchased from Dako Cytomation (Carpinteria, CA, USA). The primers and probes for mouse TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, kinin B<sub>1</sub>R, ROR- $\gamma$ T, T-bet and GAPDH were purchased from Applied Biosystems (Warrington, UK). The other reagents used were of analytical grade and obtained from different commercial sources.

#### Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  SEM of six to nine mice/group and are representative of three/four independent experiments. A statistical comparison of the data was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's or Newman-Keuls's test, depending on the experimental protocol; *p*-values less than 0.05 (*p*<0.05 or less) were considered significant. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RCD DFPL AFB JBC. Performed the experiments: RCD DFPL AFB MNM ESP CPF. Analyzed the data: RCD DFPL AFB ESP CPF JBC. Contributed reagents/materials/analysis tools: JBP. Wrote the paper: RCD DFPL CPF JBC.

#### References

- Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354: 942–955.
- McFarland HF, Marzin R (2007) Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8: 919–915.
- Hafler DA (2004) Multiple sclerosis. *IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$* . *J Clin Invest* 113: 788–794.
- Kawakami N, Odoardi F, Ziemssen T, Bradl M, Ritter T, et al. (2005) Autoimmune CD4<sup>+</sup> T cell memory: lifelong persistence of encephalitogenic T cell clones in healthy immune repertoires. *J Immunol* 175: 69–81.
- Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*.
- Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683–747.
- Walker K, Perkins M, Dray A (1995) Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 26: 1–16; discussion 17–26.
- Prediger KD, Medeiros R, Pandolfo P, Duarte FS, Passos GF, et al. (2008) Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 151: 631–643.
- Danielkova V, Gottlieb M, Nemethova M, Kravackova P, Domorokova I, et al. (2009) Bradykinin postconditioning protects pyramidal CA1 neurons against delayed neuronal death in rat hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 29: 871–878.
- Khan TK, Nelson TJ, Verma VA, Wender PA, Alkon DL (2009) A cellular model of Alzheimer's disease therapeutic efficacy: PKC activation reverses

beta-induced biomarker abnormality on cultured fibroblasts. *Neurobiol Dis* 34: 332–339.

- Caibeto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrinha DA, et al. (2004) Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 143: 803–818.
- Campos MM, Leal PC, Yunes RA, Caibeto JB (2006) Non-peptide antagonists for kinin B1 receptor: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27: 646–651.
- Prat A, Blemacki K, Sarull T, Oras JE, Garman CR, et al. (2005) Kinin B1 receptor expression on multiple sclerosis mononuclear cells: correlation with magnetic resonance imaging T2-weighted lesion volume and clinical disability. *Arch Neurol* 62: 795–800.
- Dos Santos AC, Refle E, Arantes RM, Juliano I, Pasquero JL, et al. (2008) Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *J Neuroinflammation* 5: 49.
- Göbel K, Pankratz S, Schneider-Hohendorf T, Bittner S, Schuhmann MK, et al. (2011) Blockade of the kinin receptor B1 protects from autoimmune CNS disease by reducing leukocyte trafficking. *J Autoimmun* 36: 106–114.
- Germain I, Barabe J, Galeano C (1988) Increased blood concentration of des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 83: 211–217.
- Schulze-Tropff U, Prat A, Pankratz S, Siffert V, Paterka M, et al. (2009) Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system. *Nat Med* 15: 788–793.

18. Prat A, Bienenack K, Pouly S, Nalbantoglu J, Goutare R, et al. (2000) Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropharmacol Exp Neurol* 59: 896–906.
19. Marceau F, Bachvov DR. (1996) Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* 16: 385–401.
20. Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, et al. (2009) Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* 15: 633–640.
21. Bjarnmar C, Wujck JR, Trapp BD (2003) Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 206: 165–171.
22. Kim H, Moon C, Ahn M, Lee Y, Kim S, et al. (2007) Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 1162: 113–120.
23. Gobin SJ, Montagne L, Van Zutphen M, Van Der Valk P, Van Den Elsen PJ, et al. (2001) Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions. *Glia* 36: 68–77.
24. Kivisaak P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, et al. (2009) Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 65: 457–469.
25. Tzartos JS, Friese MA, Graner MJ, Palace J, Newcombe J, et al. (2008) Interleukin 17 production in central nervous system infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172: 146–155.
26. Moldovan IR, Radick RA, Colleur AC, Born SE, Lee JC, et al. (2003) Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *J Neuroimmunol* 141: 132–140.
27. Stromnes IM, Cervoni LM, Lagget D, Harris RA, Goverman JM (2008) Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells. *Nat Med* 14: 337–342.
28. Bettelli E, Korn T, Ouksa M, Kuchroo VK (2008) Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453: 1051–1057.
29. Trapp BD, Peterson J, Ramsdoff RM, Radick R, Mork S, et al. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338: 278–285.
30. Alvarez JJ, Cayrol R, Prat A (2011) Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1812: 252–264.
31. Gerdaï R (2001) Gene targeting: technical pitfalls and potential solutions in behavioral brain research. *Behav Brain Res* 125: 13–21.
32. Crusio WE, Goldowitz D, Holmes A, Woller D (2009) Standards for the publication of mouse mutant studies. *Genes Brain Behav* 8: 1–4.
33. Kibelycznyk C, Holmes A (2011) All (C57BL/6) Mice are not Created Equal. *Front Neurosci* 5: 10.
34. Crusio WE (2004) Flanking gene and genetic background problems in genetically manipulated mice. *Biol Psychiatry* 56: 381–385.
35. Carola V, Gross C (2010) BDNF moderates early environmental risk factors for anxiety in mouse. *Genes Brain Behav* 9: 379–389.
36. Gressack JE, Rabibough VR, Scott CN, Coste S, Stenzel-Poore M, et al. (2010) Isolation rearing-induced deficits in contextual fear learning do not require CREB2 receptor. *Behav Brain Res* 209: 80–86.
37. Mycko MP, Owkimska H, Walczak A, Libert C, Raine CS, et al. (2008) A heat shock protein gene (Hsp70.1) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. *Eur J Immunol* 38: 1999–2013.
38. Ellestad KK, Tsutsui S, Noorbakhsh F, Warren KG, Yong VW, et al. (2009) Early life exposure to lipopolysaccharide suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *J Immunol* 183: 298–305.
39. Terenyi N, Nagy N, Papp K, Prechl J, Olah I, et al. (2009) Transient decompensation of mice delays onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and impairs MOG-specific T cell response and autoantibody production. *Mol Immunol* 47: 57–63.
40. Aiberti J, Viola JP, Veira-de-Abreu A, Bozza PT, Sher A, et al. (2008) Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol* 170: 5349–5353.
41. Weiss N, Miller F, Gamaloun S, Couraud PO (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 1788: 842–857.
42. Stromnes IM, Goverman JM (2006) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1: 1810–1819.
43. Zhang H, Gu YT, Xue YX (2007) Bradykinin-induced blood-brain barrier permeability increase is mediated by adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel. *Brain Res* 1144: 33–41.
44. Qin LJ, Gu YT, Zhang H, Xue YX (2009) Bradykinin-induced blood-tumor barrier opening is mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Neurosci Lett* 450: 172–175.
45. Elliott PJ, Hayward NJ, Huff MR, Nagle TL, Black KL, et al. (1996) Unlocking the blood-brain barrier: a role for RMP-7 in brain tumor therapy. *Exp Neurol* 141: 214–224.
46. Emerich DF, Dean RL, Marsh J, Pink M, Lafreniere D, et al. (2000) Intravenous ceretop (RMP-7) enhances delivery of hydrophilic chemotherapeutics and increases survival in rats with metastatic tumors in the brain. *Pharm Res* 17: 1212–1219.
47. Liu Y, Hashizume K, Chen Z, Sanoto K, Ningraj N, et al. (2001) Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors. *Neurosci Res* 23: 379–387.
48. Liu LB, Xue YX, Liu YH, Wang YB (2008) Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* 86: 1153–1168.
49. Penquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Jr., et al. (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8140–8145.
50. Walther T, Balchun D, Voigt JP, Fink H, Zschaler W, et al. (1998) Sustained long-term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* 273: 11867–11873.
51. Berkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, et al. (1995) Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* 270: 13706–13710.
52. Costa R, Morta EM, Durra RC, Manjivchi MN, Bento AF, et al. (2011) Antinociceptive effect of kinin B1 and B2 receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice. *Br J Pharmacol*.
53. Durra R, Gola M, Leite D, Bento A, Claudino R, et al. (2011) Inhibitor of PI3Kgamma ameliorates TNBS-induced colitis in mice by affecting the functional activity of CD44+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Br J Pharmacol* 163: 358–374.
54. Lwak KJ, Schmitzgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
55. Zhang M, Mao Y, Ramirez SH, Tams RF, Chahrazhvi T (2010) Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood-brain barrier permeability via oxidative stress. *Neuroscience* 171: 852–858.

