



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Stella Célio Junqueira

**INOSINA PREVINE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NOCICEPTIVA INDUZIDA PELO MODELO EXPERIMENTAL
DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Florianópolis

Stella Célio Junqueira

**INOSINA PREVINE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NOCICEPTIVA INDUZIDA PELO MODELO EXPERIMENTAL
DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cypriano
Dutra

Coorientador: Prof. Dr. Adair Roberto
Soares dos Santos

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Junqueira, Stella Célio
INOSINA PREVINE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E NOCICEPTIVA
INDUZIDA PELO MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA /
Stella Célio Junqueira ; orientador, Rafael Cypriano
Dutra ; coorientador, Adair Roberto Soares dos Santos. -
Florianópolis, SC, 2015.
103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

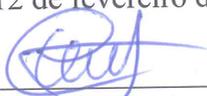
1. Neurociências. 2. Esclerose Múltipla. 3.
Encefalomielite Autoimune Experimental. 4. Inosina. 5.
Neuroinflamação. I. Dutra, Rafael Cypriano . II. dos
Santos, Adair Roberto Soares . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. IV. Título.

STELLA CÉLIO JUNQUEIRA

**“INOSINA PREVINE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NOCICEPTIVA INDUZIDA PELO MODELO
EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA”**

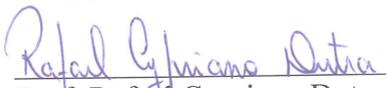
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 12 de fevereiro de 2015.



Prof. Rodrigo Bairy Leal
Coordenador do Curso

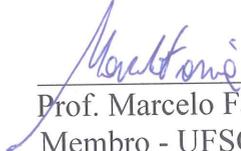
Banca Examinadora:



Prof. Rafael Cypriano Dutra
Orientador – UFSC



Profa. Andreza Fabro de Bem
Membro – UFSC



Prof. Marcelo Farina
Membro - UFSC



Profa. Nádia Rezende Barbosa Raposo
Membro externo à UFSC

AGRADECIMENTOS

À minha família, primeiramente aos meus pais João Augusto D. Junqueira e Merisander Célio Junqueira pelos ensinamentos de vida, incentivos ao estudo e apoio às minhas escolhas, e à minha irmã pelo carinho e atenção em todos os momentos. Obrigada por compreenderem minha ausência e passar muito tempo longe de vocês, mas tenham a certeza de que cada um está, além do coração, em meus pensamentos todos os dias.

Aos meus demais familiares, pelo apoio, todas as orações e torcida pelo meu sucesso.

Aos meus queridos amigos do LANDI que me receberam com todo carinho e simpatia (Preto, Rafa, Catha, Marina, Fran, Nêne, Murilo, Gaúcho, Tatilinha, Fernanda, Thay e Serginho) e por aqueles landianos que surgiram no decorrer do tempo (Róli, Carol, Glauce, Léo) pelos momentos de alegrias, apoio e de colaboração com o trabalho.

Aos demais colegas da pós-graduação que participaram direta ou indiretamente deste trabalho (Vicente, Gabi, Maurício) pelo apoio, contribuição, amizade, ensinamentos, etc.

Àqueles amigos distantes, mas que de certa forma sempre presentes em minha vida, pelo apoio, incentivo, carinho e compreensão da minha ausência.

Às amigas companheiras de casa (Aline, Paty, Elizabeth e Rafaela) por todos os momentos juntas, pela torcida e paciência no dia a dia.

Ao professor e orientador Rafael Dutra, pela paciência com minha inexperiência e incentivo à realização deste trabalho. Foi um grande aprendizado!

Ao professor Adair, por me acolher inicialmente e estar sempre disposto a colaborar com a realização deste trabalho; ao professor Calixto e Juliano por cederem o espaço físico e os animais; aos demais professores que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À CAPES, CNPq e UFSC pelo auxílio financeiro.

“A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada.”
(Karl Popper)

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune mediada por linfócitos T e caracterizada por inflamação e degeneração do sistema nervoso central (SNC). As terapias atualmente disponíveis possuem ações parcialmente efetivas e inúmeras reações adversas. A inosina tem demonstrado importante ação imunomoduladora, neuroprotetora e anti-hiperalgésica. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inosina no desenvolvimento e progressão da encefalomielite autoimune experimental (EAE), o modelo experimental de EM. **Métodos:** Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com 6 a 12 semanas. A EAE foi induzida pela inoculação de emulsão contendo glicoproteína de mielina do oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) suplementada com 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) H37Ra em ambos os flancos traseiros nos dias 0 e 7. Em adição, cada animal recebeu 300 ng de *Bordetella* toxina *Pertussis* em 100 µL de solução salina por via intraperitoneal (i.p.) no dia 0 e no dia 2 pós-imunização (p.i.). Os animais foram tratados pela via i.p., 2x dia, com inosina (1 ou 10 mg/kg) ou solução salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg). O tratamento, juntamente com a avaliação do peso corporal e dos sinais clínicos, ocorreu diariamente por 40 dias. Entre o 1º e 14º dia p.i. os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais a fim de avaliar a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio, comportamento tipo-ansioso e depressivo e sinais tipo-fadiga. No 40º dia p.i., os animais foram eutanaziados; a medula espinhal foi coletada para a avaliação histológica do processo inflamatório e desmielinizante, imuno-histoquímica para atividade astrocitária e *western blot* para a expressão dos receptores A1 e A2A, proteína cinase ERK1 e p-ERK1; os linfonodos foram coletados para análise da citocina IL-17 por ELISA. **Resultados:** A indução da EAE foi evidenciada pela presença de sinais clínicos, a partir do 12º dia p.i. no grupo EAE + veículo. A inosina (1 e 10 mg/kg) retardou o surgimento dos escores clínicos e inibiu a progressão da doença, com destaque para a dose de 1 mg/kg. Além disso, a inosina na dose de 1 mg/kg inibiu a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio, e a dose de 10 mg/kg inibiu apenas a hiperalgesia térmica evidenciadas durante a fase pré-motora da doença. Ainda observou-se que a EAE induziu comportamentos do tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e sinais tipo-fadiga no teste de nado forçado com sobrecarga durante a fase pré-motora da doença, os quais não foram revertidos pelo tratamento com inosina (1 mg/kg). Não observou-se comportamento tipo-depressivo nos animais EAE, porém

a inosina (1 mg/kg) demonstrou efeito ansiolítico no teste de suspensão pela cauda (TSC). Além disso, verificou-se no teste do LCE ausência de alterações locomotoras no período avaliado. A análise histológica demonstrou que a inosina (1 e 10 mg/kg) bloqueou a neuroinflamação e a desmielinização, sendo a dose de 1mg/kg efetiva em inibir ainda a ativação astrocitária na medula espinhal após indução da EAE. Nos órgãos linfoides periféricos, a inosina (1 e 10 mg/kg) reduziu os níveis de IL-17 exacerbada pela EAE. Ademais, a EAE aumentou a expressão do A2AR na medula espinhal e a inosina (1 e 10 mg/kg) inibiu esse efeito. Em contrapartida, a indução da EAE culminou com a diminuição significativa na expressão de A1R no SNC, a qual não foi modulada pelo tratamento com inosina. A EAE não alterou a expressão da ERK1, porém aumentou, de maneira significativa, a expressão de p-ERK1 na medula espinhal no 40º dia p.i. Entretanto, o tratamento com inosina (1 e 10 mg/kg) não modulou a fosforilação de ERK1 no SNC. **Conclusões:** Os resultados do presente trabalho demonstram que a inosina, com destaque para a dose de 1 mg/kg, retardou e reduziu os sinais clínicos motores, bem como a hiperalgesia induzidos pela EAE. O efeito da inosina na dose de 1mg/kg ocorreu, em parte, pela inibição da neuroinflamação e desmielinização, bem como por redução da atividade astrocitária, do nível de IL-17 em tecido linfóide periférico e expressão do A2AR no SNC.

Palavras-chave: Esclerose múltipla. Hiperalgesia. Neuroinflamação. Encefalomielite autoimune experimental. Inosina. A2AR.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is a T cells-autoimmune, inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Currently available therapies have partially effective actions and numerous side reactions. Inosine showed immunomodulatory, neuroprotective and anti-hyperalgesic action. The aim of this study was to evaluate the inosine effect in the development and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a MS experimental model. **Methods:** Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced in female C57BL/6 mice (6–10 weeks of age) by immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide supplemented with 500 µg of *Mycobacterium tuberculosis* extract H37Ra into the flanks on days 0 and 7. All animals were also injected intraperitoneally (i.p.) on days 0 and 2 with 300 ng of *Pertussis* toxin. During 40 days, the animals received inosine (1 or 10 mg/kg) or saline solution (0,9% NaCl, 10 mL/kg). The weight and clinical signs were evaluated daily. Among 1 and 14 days post immunization (p.i.) animals were subjected to different behavioral tests to evaluate the mechanical and cold thermal hyperalgesia, anxious and depressive-like behavior and fatigue-like signs. Forty days p.i., the animals were euthanized; the spinal cord was collected for inflammatory and demyelinating histological evaluation, astrocyte activity immunohistochemistry and expression of A1 and A2A receptors, protein kinase ERK1 and p-ERK1 by western blot; lymph nodes were collected for IL-17 cytokine analysis by ELISA assay. **Results:** In this present study, we report that EAE induction has been evidenced by clinical signs appeared on day 12 p.i. on EAE + vehicle group. Inosine (1 and 10 mg/kg) delayed the scores onset as well as the disease progression and weight loss, particularly at 1 mg/kg dose. Furthermore, inosine 1 mg/kg inhibited mechanical and cold thermal hyperalgesia, 10 mg/kg dose inhibited only thermal allodynia evidenced during the pre-motor stage of the disease. It was also found that EAE induced anxious-like behavior on the elevated plus maze test (ECL) and fatigue-like sign in the weight load swimming test (WLST) on the pre-motor stage, which were not reversed by treatment with inosine (1mg/kg). It was not observed depressive-like behavior in EAE + vehicle group, however, inosine (1 mg/kg) showed anxiolytic effect in the tail suspension test (TST). In addition, it was found in the EPM test lack of locomotor changes on the evaluated period. Histological analysis showed that inosine (1 and 10 mg/kg) blocked neuroinflammation and

demyelination in the spinal cord after EAE induction, and 1mg/kg inosine also inhibited astrocytic activity. In the secondary lymphoid tissue, inosine (1 and 10 mg/kg) inhibited the IL-17 levels exacerbated by EAE. Furthermore, EAE increased A2AR expression in the spinal cord and inosine (1 and 10 mg/kg) inhibit this up-regulation. On the other hand, EAE immunization induced down-regulation of A1R in the CNS, which was not modulated by inosine treatment. EAE did not alter the ERK1 expression, but increased p-ERK1 expression in the spinal cord at day 40 p.i. Treatment with inosine (1 and 10 mg/kg) did not modulate the ERK1 phosphorylation in the CNS. **Conclusions:** These results indicate that inosine, with emphasis on the 1mg/kg dose, delayed and reduced EAE clinical symptoms and hyperalgesia. The inosine effect is mediated, in part, by reducing neuroinflammation and demyelination, as well as reduction of astrocytic activity, IL-17 levels and A2ARs expression.

Keywords: Multiple Sclerosis. Hyperalgesia. Neuroinflammation. Experimental autoimmune encephalomyelitis. Inosine. A2ARs.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Distribuição mundial da prevalência de EM nos diferentes continentes.....	21
Figura 2 – Os quatro padrões de progressão da EM.....	26
Figura 3 – Patogênese da EM, com os respectivos mecanismos moleculares envolvidos.....	29
Figura 4 – Proteínas de membrana antigênicas que compõem a bainha de mielina no SNC.....	32
Figura 5 – Fotos ilustrativas dos sinais clínicos apresentados pelos animais no decurso da EAE.....	33
Figura 6 – Metabolismo extracelular do ATP, receptores purinérgicos P1 e P2, e vias de sinalização dos receptores adenosinérgicos (A1, A2A, A2B e A3).....	37
Figura 7 – Efeito da inosina sobre os sinais clínicos durante o desenvolvimento da EAE.....	56
Figura 8 – Efeito da inosina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela EAE.....	58
Figura 9 – Efeito da inosina sobre a hiperalgesia térmica ao frio induzida pela EAE.....	59
Figura 10 – Efeito da inosina sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pela EAE.....	60
Figura 11 – Efeito da inosina sobre comportamento tipo-ansioso durante o desenvolvimento da EAE.....	61
Figura 12 – Efeito da inosina sobre o tempo de nado forçado com sobrecarga durante a fase de indução da EAE.....	62
Figura 13 – Efeito da inosina sobre a resposta neuroinflamatória induzida pela EAE.....	64
Figura 14 – Efeito da inosina na desmielinização induzida pela EAE.	65
Figura 15 – Efeito da inosina sobre a ativação astrocitária durante o desenvolvimento da EAE.	66
Figura 16 – Efeito da inosina sobre o nível da citocina IL-17 nos linfonodos inguinais durante o desenvolvimento da EAE.....	68
Figura 17 – Efeito da inosina na expressão do receptor A2A na medula espinal dos animais após a indução da EAE.	69
Figura 18 – Efeito da inosina na expressão da enzima ERK1 na medula espinal dos animais após a indução da EAE.	70
Figura 19 – Representação esquemáticas dos efeitos obtidos pelo tratamento preventivo com inosina no modelo experimental de EM.....	82

Tabela 1 – Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento da EAE.....	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1R – Receptor A1
A2AR – Receptor A2A
AC – Adenilato ciclase
ADA – Adenosina deaminase
AMP – Adenosina monofosfato
AMPC – Adenosina monofosfato cíclico
APC – Célula Apresentadora de Antígenos
ASC – Área sob a curva
ATP – Adenosina tri-fosfato
BHE – Barreira Hemato Encefálica
BSA – Albumina sérica bovina
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CFA – Adjuvante Completo de Freund
CNS – *Central Nervous System*
CXCL 12 – Quimiocina (C-X-C) ligante 12
DMF – Dimetilfumarato
DO – Densidade óptica
DP – Doença de Parkinson
EAE – Encefalomielite Autoimune Experimental
EB – Azul de Evans
EBV – Vírus Epstein-Bar
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
EM – Esclerose Múltipla
EMPP – Esclerose Múltipla Progressiva Primária
EMPS – Esclerose Múltipla Progressiva Secundária
EMSP – Esclerose Múltipla Surto Progressiva
EMSR – Esclerose Múltipla Surto Remissão
ERK1 – *Extracellular signal-regulated kinase 1*
FDA – *Food and Drug Administration*
GA – Acetato de Glatiramer
GFAP – *Glial fibrillary acidic protein*
H&E – Hematoxilina e eosina
HHV6 – *Herpes Vírus Humano-6*
HLA – Antígenos Leucocitários Humanos
IFN β – Interferon β
IgG – Imunoglobulina G
IL – Interleucina
i.p. – Intraperitoneal

IRM – Imagens de Ressonância Magnética
LCE – Labirinto em cruz elevado
LFB – *Luxol fast blue*
LTh – Linfócitos T *helper*
LTreg – Linfócitos T regulatórios
MBP – Proteína Básica de Mielina
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMPs – Metaloproteinases
MOG – Glicoproteína de Mielina de Oligodendrócitos
NF- κ B – Fator Nuclear Kappa B
PA – Potencial de ação
p.i. – Pós-imunização
PKA – Proteína cinase A
PLP – Proteo-lipoproteína
PBS – Solução de tampão fosfato
PMSF – Fluoreto fenilmetilsulfonil
QV – Qualidade de vida
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
TBS – Tampão salina-tris
TBS-T – Tampão salina-tris com tween
TCS – Teste do consumo de sacarose
TSC- Teste de suspensão pela cauda
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
VCAM 1 – Molécula de Adesão Celular Vascular 1
VFH – Filamentos de von Frey
VLA 4 – Integrina $\alpha 4\beta 1$
WLST – Teste do nado forçado com sobrecarga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM).....	20
1.1.1 Histórico.....	20
1.1.2 Epidemiologia e Etiologia da EM.....	20
1.1.3 Sintomas e medidas de diagnóstico na EM.....	24
1.1.4 Classificação dos padrões de progressão da EM.....	26
1.1.5 Mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da EM.....	27
1.1.6 O modelo animal de encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	30
1.1.7 Terapias imunomoduladoras na EM.....	33
1.2 O SISTEMA PURINÉRGICO.....	36
1.3 INOSINA.....	37
1.4 RECEPTORES DE ADENOSINA E INOSINA.....	39
1.5 EM E INOSINA.....	41
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 ANIMAIS.....	45
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA EAE E TRATAMENTO COM INOSINA.....	45
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	46
3.3.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	47
3.3.2 Avaliação da hiperalgesia térmica ao frio.....	47
3.3.3 Teste de consumo de sacarose (TCS).....	47
3.3.4 Labirinto em cruz elevado (LCE).....	48
3.3.5 Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	48
3.3.6 Teste do nado forçado com sobrecarga (WLST).....	49
3.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	49
3.5 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	50
3.6 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA IL-17.....	51
3.7 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	52
3.8 FÁRMACOS E REAGENTES.....	53
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 EFEITO DA INOSINA SOBRE OS SINAIS CLÍNICOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA EAE.....	55
4.2 EFEITO DA INOSINA SOBRE A HIPERALGESIA INDUZIDA PELA EAE.....	57

4.3 EFEITO DA INOSINA SOBRE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E ANSIOSO.....	59
4.4 EFEITO DA INOSINA SOBRE O TEMPO DE NADO FORÇADO COM SOBRECARGA DURANTE A FASE DE INDUÇÃO DA EAE.....	62
4.5 EFEITO DA INOSINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DESMIELINIZANTE INDUZIDA PELA EAE.....	62
4.6 EFEITO DA INOSINA SOBRE A ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA EAE.....	65
4.7 EFEITO DA INOSINA SOBRE O NÍVEL DA CITOCINA IL-17 EM LINFONODOS INGUINAIS APÓS A INDUÇÃO DA EAE.....	66
4.8 EFEITO DA INOSINA NA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES A1 E A2A NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS APÓS INDUÇÃO DA EAE.....	68
4.9 EFEITO DA INOSINA NA EXPRESSÃO E FOSFORILAÇÃO DA ENZIMA ERK1 NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS APÓS A INDUÇÃO DA EAE.....	70
5 DISCUSSÃO.....	71
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso é um sistema de comunicação complexo que proporciona ao organismo interação entre seus componentes internos, assim como do próprio organismo com o meio externo. Subdividido em central (SNC) e periférico (SNP), o sistema nervoso compreende componentes sensoriais e motores capazes de integrar, processar e armazenar informações, além de fornecer repostas efetoras. A estrutura complexa do SNC é composta por neurônios e células da glia (astrócitos, oligodendrócitos e microglia), cujas funções englobam auxílio no controle do ambiente neuronal, suporte da transmissão do potencial de ação ao longo do neurônio e mecanismos de defesa celular (KANDEL, 2000; WILLIS JR, 2003)

Nesse ambiente, para que uma informação seja transmitida pelo sistema de comunicação, é necessária a propagação e transmissão do potencial de ação (PA) pela rede neuronal. A condução do PA pelos axônios se torna mais rápida quando estes são envoltos pela bainha de mielina. No SNC, os oligodendrócitos são as células produtoras e mantedoras dessa bainha lipoproteica (KANDEL, 2000; NAVE, 2010). Quando na presença de determinadas alterações no ambiente neuronal, provenientes de fatores genéticos, certas infecções virais e células do próprio sistema imunológico, uma danificação na bainha de mielina com consequente desmielinização axonal pode vir a ocorrer (RAMAGOPALAN *et al.*, 2010). Em decorrência desse processo, a transmissão do PA é prejudicada e, conseqüentemente, as funções relacionadas ao neurônio acometido, tais como percepções sensoriais, cognição e atividades motoras (KANDEL, 2000; WILLIS JR, 2003).

Neste contexto, a Esclerose Múltipla (EM), uma doença inflamatória crônica e desmielinizante do SNC, mediada por resposta autoimune com consequente neurodegeneração progressiva merece atenção (NYLANDER e HAFLER, 2012; SAWCER, FRANKLIN e BAN, 2014). Atualmente, a EM tem distribuição mundial atingindo cerca de 2,5 milhões de pessoas (FEDERATION, 2013), sendo considerada a razão mais comum de prejuízos neurológicos não traumáticos em jovens adultos, comprometendo sua qualidade de vida (QV) pessoal e social, além de gerar altos custos para o sistema de saúde na manutenção da QV em pacientes portadores (BLAHOVA DUSANKOVA *et al.*, 2012).

1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

1.1.1 Histórico

Os primeiros relatos a compor a história da EM surgiram em meados do século XIX, quando Robert Carswell descreveu lesões medulares acompanhadas de atrofia em paciente pós-mortem, consideradas descrições de uma nova patologia (COMPSTON e COLES, 2008). Em 1868, a observação de Jean Martin Charcot do acúmulo de células inflamatórias na substância branca do encéfalo e da medula espinhal de pacientes com disfunções neurológicas, conduziu à terminologia “esclerose em placas disseminadas”, posteriormente denominada EM (HAFLER, 2004).

Após, grandes avanços foram alcançados no que se refere às possíveis causas da doença. Em 1884, Pierre Marie apontou o provável envolvimento de um agente infeccioso (MOREIRA *et al.*, 2002). Já em 1933, Thomas Rivers sugeriu que a EM era consequência da resposta autoimune em indivíduos geneticamente susceptíveis. Anos após, a constatação do aumento de imunoglobulinas (Ig) oligoclonais no líquido de portadores da doença por Elvin Kabat, em 1948, conduziu a hipótese da natureza inflamatória da doença (HAFLER, 2004).

Embora a causa inicial da doença ainda seja parcialmente desconhecida, inúmeras pesquisas realizadas nos últimos anos buscaram uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à patogênese da EM. Assim, atualmente, a EM é definida como uma doença autoimune mediada por linfócitos T autorreativos. A neuroinflamação, induzida pela migração de células linfocitárias decorrente do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) resulta no processo neurodegenerativo, caracterizado por desmielinização, dano axonal, morte de neurônios e oligodendrócitos, com consequente déficit motor, sensitivo e cognitivo (MCFARLAND e MARTIN, 2007).

1.1.2 Epidemiologia e Etiologia da EM

A EM, ao contrário da maioria das doenças neurodegenerativas, é prevalente em adultos jovens (20 a 40 anos) e atinge preferencialmente as mulheres (COMPSTON e COLES, 2008). A maior incidência da doença atinge regiões norte da América do Norte e Europa (140 e 108 casos por 100.000 habitantes, respectivamente), classificados como países de alto risco, juntamente com o sul do Canadá, Nova Zelândia e sul da Austrália. O sul da Europa e EUA possuem média prevalência, ao

passo que a África e o leste da Ásia (2,1 e 2,2 casos por 100.000 habitantes, respectivamente) estão classificados como países de menor risco (MORALES, PARISI e LUCCHINETTI, 2006). Pesquisas revelam que a frequência de casos de EM na América Latina tem aumentado consideravelmente (RIVERA et al., 2014), o que a coloca em fase de transição de baixa para média prevalência (CRISTIANO, PATRUCCO e ROJAS, 2008). Cabe ressaltar que o Brasil encontra-se, atualmente, entre os países de médio risco, com estimativa de 10 a 30 casos para cada 100.000 habitantes (MORALES, PARISI e LUCCHINETTI, 2006) (Figura 1).



Figura 1: Distribuição mundial da prevalência de EM nos diferentes continentes. Fonte: Adaptado de <http://www.atlasofms.org/>

Conforme descrito anteriormente, a etiologia da EM não é inteiramente conhecida, e dados atuais sugerem que uma combinação entre fatores genéticos e ambientais sejam capazes de desencadear a doença.

Fatores genéticos

A susceptibilidade genética do indivíduo à EM pode ocorrer por influência de sua origem étnica, havendo grupos de maior e menor risco. Estudos demonstram que americanos nativos e com descendência africana, mexicanos, porto-riquenhos, japoneses, filipinos e chineses possuem baixa prevalência da EM, o que aponta para um efeito racial geneticamente determinado (KURTZKE, BEEBE e NORMAN, 1979).

Dados de históricos familiares referentes à EM raramente ultrapassam de 3-4 casos (WILLER *et al.*, 2007), seguidos da redução nos riscos em adquirir a doença nas gerações seguintes, a qual reduz de 20% para, aproximadamente, 3-1% (ROBERTSON *et al.*, 1996). Além

disso, estudos epidemiológicos em diferentes países sugerem a ausência no padrão de incidência da EM em gêmeos. A taxa de gêmeos homozigóticos portadores da doença no Canadá e Reino Unido sobrepõe-se à taxa de heterozigóticos (25% versus 5%) (MUMFORD *et al.*, 1994; WILLER *et al.*, 2003), enquanto na Itália e França têm-se taxas equivalentes (SCLEROSIS., 1992; RISTORI *et al.*, 2006).

Associação entre EM e variações genéticas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), especificamente em genes codificadores de HLA (antígeno leucocitário humano), geraram indícios do novo fator genético nos anos 70 (COMPSTON, BATCHELOR e MCDONALD, 1976; RAMAGOPALAN e EBERS, 2009). Embora os haplotipos protetores de HLA possam influenciar na susceptibilidade à doença, assim como na sua distribuição, fatores como o polimorfismo genético dificultam as pesquisas (RAMAGOPALAN *et al.*, 2007; HORTON *et al.*, 2008).

Mundialmente, a EM é prevalente no sexo feminino, cuja razão de incidência mulher/homem tem aumentado nas últimas décadas (2,3 a 3,5:1), sendo, consideravelmente, mais elevada em regiões como leste da Ásia e América do Norte (COMPSTON e COLES, 2008; FEDERATION, 2013). Embora a razão para essa diferença de risco entre os sexos não seja totalmente compreendida, estudos genômicos buscam demonstrar correlações entre o sexo feminino e a EM. De acordo com pesquisadores, o cromossomo X pode estar diretamente correlacionado à autoimunidade (SELMI, 2008). Observou-se que a susceptibilidade ao modelo animal de EM, a EAE (encefalomielite autoimune experimental), é maior na presença de dois cromossomos X (SMITH-BOUVIER *et al.*, 2008). Além disso, Voskuhl e colaboradores (1996) demonstraram que, células T obtidas de linfonodos provenientes de doadores fêmeas são capazes de induzir resposta imune, assim como o desenvolvimento da EAE, de forma muito mais agressiva quando comparado a doadores machos.

Logo, evidências como a existência da discordância na razão de gêmeos homozigóticos portadores de EM, assim como o rápido aumento na prevalência da doença entre mulheres, demonstram a relevância dos fatores ambientais no desenvolvimento da EM.

Fatores Ambientais

Há décadas, pesquisadores permanecem na busca contínua por fatores ambientais que podem estar associados aos riscos de susceptibilidade à EM. Os fatores que tem atraído a maior atenção são: infecções virais pré-definidas (KIM *et al.*, 2000; GOODIN, 2009), alta

exposição ao tabaco (HERNAN, OLEK e ASCHERIO, 2001), contrariamente, baixa exposição à luz solar e a produção reduzida de vitamina D (PIERROT-DESEILLIGNY, 2009; ASCHERIO, MUNGER e SIMON, 2010).

Dentre os alvos virais de potencial associação à EM, o de maior interesse entre os pesquisadores é a infecção causada pelo vírus *Epstein-Bar* (EBV). Dados prévios demonstraram que mais de 99% dos pacientes portadores de EM são soropositivos para EBV (GOODIN, 2009). Apesar da alta prevalência do vírus na população em geral, a soronegatividade para o mesmo está associada ao baixo risco no desenvolvimento da EM (ASCHERIO e MUNGER, 2007). Por outro lado, uma infecção sintomática por EBV pode duplicar os riscos de adquirir a doença (HANDEL *et al.*, 2010). Outro possível agente infeccioso associado à EM é o *herpes* vírus humano-6 (HHV6), uma vez detectado sua presença no soro, fluido cérebro-espinal e lesões em tecidos de portadores de EM (CHALLONER *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2000). Ademais, o HHV6 possui potencial neurotrópico, com elevada afinidade para oligodendrócitos e mielina (ALBRIGHT *et al.*, 1998), além de infectar linfócitos T com suposto efeito modulatório do sistema imune (DOCKRELL, SMITH e PAYA, 1999). Uma das hipóteses que explica a possível correlação entre as infecções virais e a EM é o mimetismo molecular. Segundo esta hipótese, após a exposição ao patógeno, o complexo MHC/epítipo presente na célula apresentadora de antígeno (APC) assemelha-se a um peptídeo endógeno, por exemplo, a proteína básica de mielina (MBP) quando complexada ao MHC (LIBBEY, MCCOY e FUJINAMI, 2007; CHASTAIN e MILLER, 2012), iniciando assim, a resposta autoimune no hospedeiro.

Dentre os fatores ambientais não-infecciosos, a deficiência de vitamina D associada à baixa exposição solar são elementos potenciais para a correlação entre a prevalência da EM a determinadas regiões, pois trata-se de uma doença prevalente em altas latitudes, as quais apresentam intensidade e duração da luz solar reduzidas (ASCHERIO, MUNGER e SIMON, 2010; SIMPSON *et al.*, 2011). A exposição à luz ultravioleta B é a principal forma de obtenção da vitamina D, pois a ingestão alimentar contribui com apenas 30% nos níveis endógenos, a qual ainda não é biologicamente ativa (HOLICK, 2004). A forma biologicamente ativa da vitamina D é a 1,25-diidroxivitamina D3, cujo papel central é a modulação da resposta imune, devido à presença de receptores para a vitamina na maioria das células imunológicas (BHALLA *et al.*, 1984). Estudos com portadores de EM revelam baixo nível sérico de vitamina D, os quais têm sido associados aos períodos de

surtos (SIMPSON *et al.*, 2010; RUNIA *et al.*, 2012). Autores sugerem que a vitamina D estimule a proliferação de células troco neurais, bem como sua diferenciação em oligodendrócitos (SHIRAZI *et al.*, 2015). Além disso, pesquisas anteriores têm demonstrado o efeito protetor da vitamina D, tanto na EM quanto na EAE, associado ao aumento do nível da citocina anti-inflamatória IL-10 (SPACH *et al.*, 2006; FARSANI, BEHMANESH e SAHRAIAN, 2015). A elevação dos níveis séricos de vitamina D em paientes com EM, como por ingestão suplementar, têm demonstrado correlação ao desenvolvimento da doença atuando na redução dos escores clínicos (MUNGER *et al.*, 2004; FARSANI, BEHMANESH e SAHRAIAN, 2015)

Ademais, o tabaco também fora reconhecido um fator de risco ambiental para a EM, baseando-se em evidências que relatam maior incidência da doença em fumantes (HERNAN, OLEK e ASCHERIO, 2001). Cabe ressaltar que pesquisadores sugerem haver uma interação do cigarro com os fatores de risco genéticos associados ao surgimento da EM, uma interação não observada em não fumantes. Além disso, outras substâncias presentes no cigarro, além da nicotina, parecem estar envolvidas com o aparecimento da EM, principalmente, pelo fato de que apenas o uso do tabaco não eleva os riscos em adquirir a doença (HEDSTROM *et al.*, 2009).

1.1.3 Sintomas e medidas de diagnóstico na EM

A EM é uma doença associada a uma ampla variedade de sintomas. Inicialmente, observam-se distúrbios sensoriais, sendo mais comum a parestesia (dormência e formigamento) e disestesia (modificação na percepção dos sentidos, sobretudo do tato), além de diplopia, ataxia e vertigem. Distúrbios do esfíncter urinário com consequente incontinência urinária acometem mais de 90% dos pacientes, ao passo que a constipação intestinal atinge em torno de 30% deles. Outro sinal comum presente na EM é a neurite óptica, seguida de perda parcial ou total da visão. Aproximadamente 90% dos pacientes sofrem de fadiga, debilidade de grande influência na rotina de trabalho mais comumente associada à EM (HAUSER SL, 2008). Entretanto, o déficit locomotor é provavelmente a deficiência mais comprometedora das atividades diárias do paciente com EM. A mobilidade ainda pode ser afetada pela perda de equilíbrio, fraqueza e espasmos musculares que atingem principalmente os membros inferiores (VAN ASCH, 2011).

Embora a prevalência da dor varie de 29% (CLIFFORD, 1984) até 86% nos portadores de EM (STENAGER, KNUDSEN e JENSEN,

1995), cabe ressaltar que se trata de um sintoma relativamente comum em pacientes com a doença e sua manifestação colabora de forma vigorosa para a redução na QV (SVENDSEN *et al.*, 2003). Exemplos deste fato podem ser observados em estudos realizados por Gallien e colaboradores (2014), no qual 12% dos pacientes com EM classificam a dor como o pior sintoma. Dentre os tipos de dor relatados pelos pacientes nessa pesquisa, a dor neuropática representou 29%, perdendo apenas para as dores de cabeça (36%) (GALLIEN *et al.*, 2014). A dor neuropática é, atualmente, definida pela *International Association for the Study of Pain* (IASP) como a dor decorrente de uma lesão ou enfermidade afetando o sistema somatossensorial. Já em relação à sensação dolorosa obtida, pode-se gerar uma hiperalgesia, por meio de um estímulo que aumente a sensibilidade à dor, ou uma alodínia, que provirá de um estímulo naturalmente incapaz de ativar nociceptores (LOESER e TREEDE, 2008). A manifestação da dor neuropática em pacientes com EM pode ocorrer por alodínia mecânica ou ao frio, assim como por hiperalgesia mecânica e térmica (OSTERBERG, BOIVIE e THUOMAS, 2005; SVENDSEN *et al.*, 2005).

Neste contexto, pode-se observar que dentre os mais variados sintomas da EM, as manifestações clínicas na maioria dos pacientes são distúrbios motores, sensoriais e visuais, ou seja, sintomas não específicos da doença, o que dificulta o seu diagnóstico (COMPSTON e COLES, 2008). Além disso, não é possível diagnosticar EM por ensaios imunológicos específicos, sendo o histórico clínico do paciente o meio mais utilizado e, quando necessário, os exames de imagem do SNC (HAFLER, 2004). As imagens de ressonância magnética (POLLAK *et al.*, 2002) tem sido importante para diagnosticar a doença em sua fase inicial de forma mais precisa por meio da revelação de placas de esclerose na substância branca do SNC em mais de 95% dos pacientes. No entanto, apenas a presença de múltiplas lesões ou lesões acompanhadas de sintomas clínicos não confirma a doença (COMPSTON e COLES, 2008). A análise imunológica colabora grandemente na compreensão da patogênese da EM e seus diferentes cursos de progressão. Embora não haja marcadores biológicos específicos, a análise do sangue periférico de pacientes busca detectar alterações nos níveis de mediadores inflamatórios e linfócitos, permitindo assim auxiliar no diagnóstico da doença, como também determinar em qual estágio ela se encontra (TORTORELLA *et al.*, 2014). Além disso, utiliza-se o método de eletroforese proteica do líquido do paciente, a fim de detectar bandas oligoclonais, as quais, quando

presentes, sugerem a síntese de Ig intratecal, encontrada em torno de 90% dos pacientes com EM (COMPSTON e COLES, 2008).

1.1.4 Classificação dos padrões de progressão da EM

Atualmente, a EM é classificada segundo diferentes subtipos, ou padrões de progressão, os quais permitem “prever” a evolução da doença (HAFLER, 2004) (Figura 2).

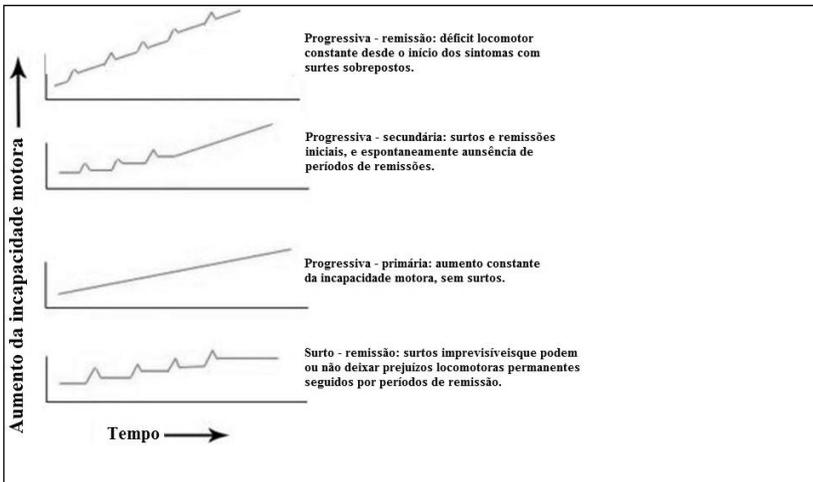


Figura 2: Os quatro padrões de progressão da EM. Progressiva – remissão, Progressiva – secundária, Progressiva – primária e Surto – remissão. Figura adaptada de Andersson *et al.* (1999).

A forma surto-remissão (EMSR) é o tipo mais comumente diagnosticado em pacientes com EM (85%), caracterizada pela exacerbação dos sintomas em surtos seguida de períodos de recuperação dos mesmos – denominado remissão (GOLDENBERG, 2012). Quando a recuperação após os surtos torna-se reduzida, as debilidades neurológicas se acumulam, pois a neurodegeneração torna-se progressiva. É o que ocorre com aproximadamente 80% dos pacientes com EMSR, ou seja, uma evolução para a EM progressiva secundária (EMPS) (CONFAVREUX *et al.*, 2000; FEDERATION, 2013). Atingindo cerca de 10% dos pacientes, a forma progressiva primária (EMPP) caracteriza-se desde o início pela ausência de surtos, porém com agravamento gradual dos sintomas e carência de períodos de remissão. A última e mais rara forma de EM é a surto-progressiva

(EMSP), diagnosticada em, apenas, 5% dos pacientes, caracterizada por progressão contínua da doença com pequenos surtos sem períodos de remissão, com a possibilidade de haver alguma recuperação (GOLDENBERG, 2012).

1.1.5 Mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da EM

Os mecanismos moleculares que desencadeiam a EM estão sob contínua investigação (NYLANDER e HAFLER, 2012). Acredita-se que o processo inicia-se por meio de uma resposta autoimune contra proteínas de mielina, seguida de intensa migração de linfócitos T autorreativos para o SNC (COMPSTON e COLES, 2008). Embora células T autorreativas sejam comumente encontradas no líquido e sangue periférico de pessoas saudáveis, há uma ativação acentuada destas células em pacientes com EM (FROHMAN, RACKE e RAINE, 2006), ou seja, possuem maior interação com a BHE e consequente inflamação no SNC (COMABELLA e KHOURY, 2012). No entanto, até o presente momento, pouco se sabe acerca de como a ativação dessas células T ocorre nos linfonodos. O mecanismo provável que justifica tal processo é a ocorrência do mimetismo molecular ou reatividade cruzada, conforme já descrito anteriormente, no qual o mimetismo ocorre entre epítomos virais ou microbianos e epítomos de mielina (WUCHERPFENNIG e STROMINGER, 1995). Esses fragmentos protéicos são reconhecidos pelas APCs, tais como as células dendríticas, e subsequentemente apresentados na periferia às células T, através do MHC classe II. Em seguida, moléculas co-estimuladoras induzem a ativação, proliferação e diferenciação dessas células T em células efetoras, tais como linfócitos Th (linfócitos T helper) CD4⁺ Th1, Th17, Th2 e Treg (T regulatórios), dentre outros (KOCH *et al.*, 2013).

Após a ocorrência da ativação e proliferação de linfócitos T autorreativos, segue o processo de migração dessas células pela BHE. Essa etapa depende da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais. Dentre essas, cita-se a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), a qual interage com as moléculas de adesão expressas na membrana dos linfócitos T autoimunes, por exemplo, a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) (HAFLER, 2004). Além disso, quimiocinas, tais como a CXCL 12 (HOLMAN, KLEIN e RANSOHOFF, 2011), e metaloproteinases (MMPs) (WAUBANT *et al.*, 1999) também favorecem a migração e penetração dos linfócitos T autorreativos para o SNC.

No SNC, as células T são reativadas por APCs, principalmente, a microglia, as quais em conjunto liberam radicais livres, citocinas e proteases que contribuem para a neuroinflamação, desmielinização e neurodegeneração axonal crônica (COMABELLA e KHOURY, 2012). Conforme já mencionado, linfócitos T ativados se diferenciam em distintas linhagens, algumas das quais produzem citocinas pró-inflamatórias, como os linfócitos Th1 e Th17, enquanto outras secretam citocinas anti-inflamatórias, como o Th2 (MOSMANN *et al.*, 1986).

A célula Th17, produtora da citocina pró-inflamatória IL-17, tem demonstrado alto potencial patogênico na EM, uma vez que possui maior expressão de marcadores de ativação, co-estimuladores e moléculas de adesão que as células Th1 (BRUCKLACHER-WALDERT *et al.*, 2009). Dados revelam alta expressão de IL-17 no sangue, líquido e tecido cerebral de pacientes com EM (TZARTOS *et al.*, 2008), estando fortemente associada às placas de desmielinização e à severidade da doença (MATUSEVICIUS, 1999, HEDEGAARD 2008). O potencial patogênico da IL-17 está correlacionado à infiltração de células T, pois contribui com a adesão celular à BHE e com a regulação de diferentes vias de sinalização pró-inflamatórias (SHABGAH 2014), facilitando, assim, a neuroinflamação (KEBIR 2007; STROMNES *et al.*, 2008). Por outro lado, um possível comprometimento na função das células anti-inflamatórias Treg e Th2 em pacientes com EM seja responsável pela incapacidade em suprimir a ativação de células T reativas à mielina (VIGLIETTA *et al.*, 2004).

Além das células T CD4⁺, evidências têm sugerido o importante papel das células T CD8⁺ na patogênese da EM. Por exemplo, o número elevado no infiltrado inflamatório de lesões do SNC (BABBE *et al.*, 2000), a presença de uma expansão clonal dessas células e sua persistência por anos no líquido (SKULINA *et al.*, 2004), além da possível influência no aumento da permeabilidade vascular do SNC (JOHNSON *et al.*, 2007) e uma relação causal sobre o dano nos axônios (BITSCH *et al.*, 2000) tem sido evidenciada em pacientes com EM.

Estudos indicam que a imunidade humoral também apresenta função significativa na patogênese da EM, baseada em fatos como: o número elevado de células B (QIN *et al.*, 1998) e uma produção intratecal persistente de IgG oligoclonais no líquido de pacientes com EM (LINK e HUANG, 2006); a participação direta dos linfócitos B no processo de desmielinização, através da produção de anticorpos específicos contra os oligodendrócitos, juntamente, com os diferentes mediadores inflamatórios presentes no ambiente neuroinflamatório (O'CONNOR *et al.*, 2005) (Figura 3).

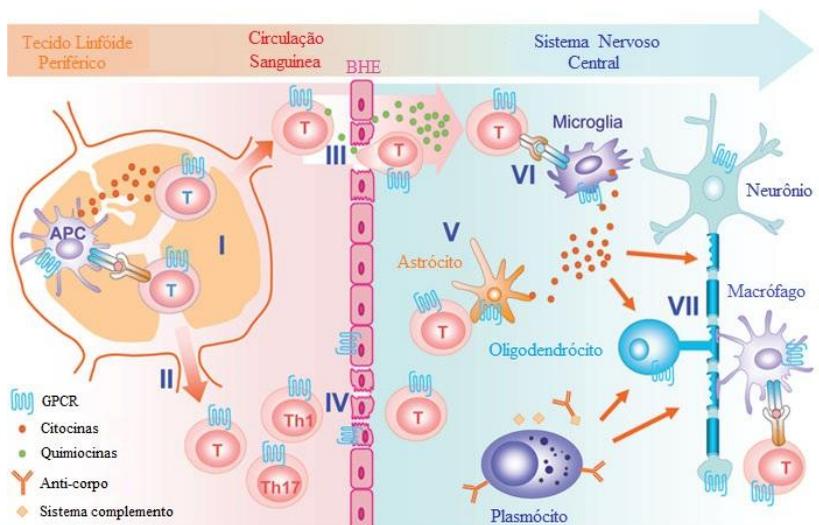


Figura 3: Patogênese da EM, com os respectivos mecanismos moleculares envolvidos. I: apresentação de antígeno (fragmentos proteicos semelhantes aos da mielina) pelas APC às células T ativando-as (células T efectoras autorreativas) nos órgãos linfóides periféricos, II: proliferação e diferenciação de células T efectoras em linfócitos Th1 e Th17 autorreativos, na corrente sanguínea, III: liberação de quimiocinas favorecendo a migração e infiltração de células T efectoras da periferia para o SNC, IV: aumento da permeabilidade da BHE pelas moléculas de adesão celular, V: células T efectoras ativam astrócitos a liberarem citocinas pró-inflamatórias, VI: microglia apresenta fragmentos proteicos de mielina aos linfócitos (Th1 e Th17) reativando-os no SNC, VII: processo de desmielinização envolvendo perda de oligodendrócitos e dano axonal devido à neurotoxicidade induzidas por linfócitos Th1 e Th17 autorreativos, linfócitos CTL, linfócitos B, macrófagos, astrócitos e microglia ativados. APC: célula apresentadora de antígeno, T: linfócito T, Th1: célula T helper 1, Th17: célula T helper 17, BHE: barreira hematoencefálica, GPCR: receptor acoplado à proteína G, CTL: linfócito citotóxico CD8⁺. Figura adaptada de Du e Xie (2012).

Conforme discutido anteriormente, muitos componentes do sistema imunológico estão envolvidos na desmielinização, morte de oligodendrócitos e dano axonal que ocorrem na EM (LASSMANN, VAN HORSSSEN e MAHAD, 2012). No entanto, outros fatores não-imunológicos contribuem para a neurodegeneração durante a doença (ELLWARDT e ZIPP, 2014). O estresse oxidativo, consequente ao processo inflamatório, leva à produção de espécies reativas de oxigênio que provocam disfunção mitocondrial (MAHAD *et al.*, 2008), um fator

importante em doenças neurodegenerativas (QUINTANILLA e JOHNSON, 2009; HAUSER e HASTINGS, 2013). Na EM, dados anteriores demonstram intenso dano mitocondrial com consequente disfunção na atividade oxidativa celular, os quais contribuem para o dano tecidual pela falha no suprimento de oxigênio pelos oligodendrócitos e neurônios (MAHAD *et al.*, 2008). Paralelamente, o neurotransmissor excitatório glutamato também está correlacionado à neurodegeneração e neuroinflamação (ELLWARDT e ZIPP, 2014). Sob condições patológicas, neurônios, astrócitos e células imunológicas são capazes de secretar grandes quantidades de glutamato (LI *et al.*, 1999; YE *et al.*, 2003; MCFARLAND e MARTIN, 2007), a qual está diretamente relacionada à morte neuronal e de oligodendrócitos. Essa ideia suporta os altos níveis deste neurotransmissor em lesões de pacientes com EM (SRINIVASAN *et al.*, 2005), assim como sua associação aos danos na mielina, oligodendrócitos e axônios (MICU *et al.*, 2006). Dentre as diferentes vias de sinalização, a via das MAPKs, a qual compreende a ERK1/2, possui envolvimento no controle da resposta imunológica (GARRINGTON e JOHNSON, 1999), o que a torna alvo de interesse na patogênese da EM. Dados anteriores indicam que a severidade clínica da EAE pode ser bloqueada por inibidores de ERK (BRERETON *et al.*, 2009). A inibição ERK1/2 via Raf1 em células T resulta em consequente redução do processo inflamatório (HUANG *et al.*, 1997; LAPPAS, RIEGER e LINDEN, 2005). Ademais, Tan e colaboradores (1999) demonstraram que a inibição de ERK1/2 está correlacionada à reduzida liberação de TNF- α pela micróglia. Entretanto, estudos prévios *in vivo* demonstraram que a deleção gênica de ERK1 exacerba a progressão e a severidade da EAE (AGRAWAL *et al.*, 2006). Autores sugerem que o aumento na fosforilação de ERK contribui para a maturação de oligodendrócitos *in vitro* e, consequentemente, com o processo remielinizante (FYFFE-MARICICH *et al.*, 2013).

1.1.6 O modelo animal de encefalomielite autoimune experimental (EAE)

Muitos dos elementos envolvidos na patogênese da EM descritos anteriormente foram identificados no modelo experimental de encefalomielite autoimune experimental (EAE), o que a torna o modelo mais utilizado para o estudo da EM, assim como para a identificação de novos alvos e agentes farmacológicos (FAROOQI, GRAN e CONSTANTINESCU, 2010). No entanto, ao contrário da EM, a EAE se

desenvolve a partir de uma imunização externa, enquanto em humanos a sensibilização aos autoantígenos ocorre de forma natural (GRAN, 2007). Juntamente ao desconhecido fator causal da EM, essa é a principal limitação do modelo, que o impede de ser utilizado para investigação dos possíveis eventos iniciais que desencadeiam a EM (STROMNES e GOVERMAN, 2006).

O modelo da EAE surgiu em 1925, através da observação de que coelhos imunizados com homogenato de medula espinhal humana exibiam inflamação no SNC, com posterior paralisia. Atualmente, a indução da EAE pode ocorrer de duas maneiras distintas: ativa ou passiva. Para a imunização ativa, utiliza-se peptídios ou proteína de mielina (Figura 4) como a MBP, a proteolipoproteína (PLP) ou glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG) em adjuvante completo de Freund (CFA). Esses peptídios de mielina são inoculados via subcutânea nos flancos traseiro do roedor, de forma que células do sistema imune inato, como células dendríticas, captam esse antígeno e o apresentam às células T nos órgãos linfoides periféricos. Assim, inicia-se a cascata patogênica da EAE no animal, de forma semelhante à EM. (STROMNES e GOVERMAN, 2006a). Por outro lado, a imunização passiva ocorre pela transferência de células T $CD4^+$ previamente reativas aos antígenos de mielina. Nesse método de imunização, não ocorre uma primeira apresentação do antígeno aos linfócitos T no tecido linfóide periférico. Essas células diferenciadas, já efectoras ao serem inoculadas, seguem o processo de neuroinflamação migrando do tecido linfóide periférico para o SNC. (STROMNES e GOVERMAN, 2006b).

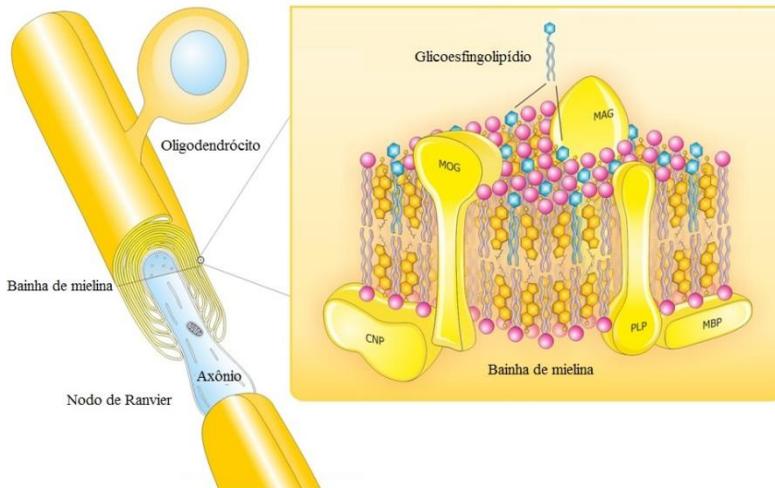


Figura 4: Proteínas de membrana antigênicas que compõem a bainha de mielina no SNC. PLP: proteolipoproteína, MAG: glicoproteína associada à mielina, MOG: glicoproteína de mielina dos oligodendrócitos, MBP: proteína básica de mielina, CNP: 3'-fosfodiesterase 2'3'-nucleotídeo cíclico. Figura adaptada de Podbielska *et al.* (2013).

O modelo da EAE é comumente utilizado em ratos e camundongos, porém os últimos são favorecidos devido à ampla variedade genética, modelos de deleção gênica e a grande disponibilidade de reagentes para essa espécie (STROMNES e GOVERMAN, 2006a). Desse modo, de acordo com a linhagem o curso da EAE pode suceder de diferentes formas. Por exemplo, a imunização de camundongos C57BL/6 com MOG35-55 pode induzir a forma monofásica ou crônica da EAE (STROMNES e GOVERMAN, 2006a), enquanto camundongos SJL/J ao serem imunizados com PLP139-151 desencadeia o tipo surto-remissão da EM (MCRAE *et al.*, 1995). No caso dos ratos, a imunização da linhagem Lewis com MBP é capaz de gerar intensa neuroinflamação, mas com pouca ou nenhuma desmielinização (MEESON *et al.*, 1994). Por outro lado, ratos Dark Argouti induzidos à EAE com MOG sofrem desmielinização e lesões medulares acompanhadas de infiltrado inflamatório no SNC (TANUMA, SHIN e MATSUMOTO, 2000).

Os sinais clínicos manifestados pelos animais susceptíveis à EAE iniciam-se com a perda do tônus da cauda, progredindo para a paralisia dos membros posteriores e anteriores, como ilustrado na Figura 5. Para

se avaliar a severidade clínica da EAE, utiliza-se uma escala de escores de 0-5, sendo que os sinais, geralmente, iniciam-se entre os dias 9 - 14 pós-imunização, podendo diferir no próprio grupo experimental, com uma incidência inferior a 100% (STROMNES e GOVERMAN, 2006a).

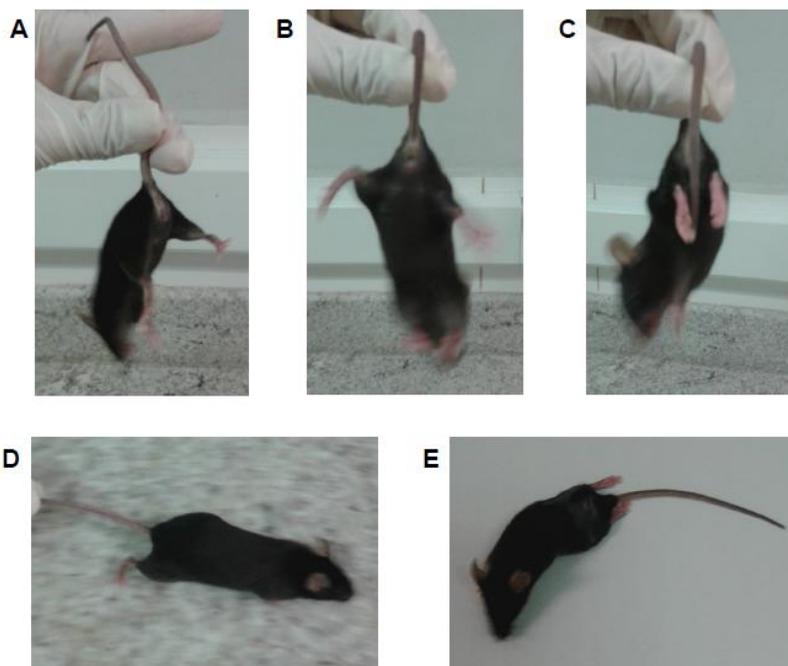


Figura 5: Fotos ilustrativas dos sinais clínicos apresentados pelos animais no decorrer da EAE. A-E: animais imunizados com 200 μ g de MOG₃₅₋₅₅ (dia 0 e dia 7) nos flancos traseiros, tratados apenas com salina. A e D: animais no dia 0 da imunização apresentam cauda com tônus e patas posteriores normais; B: animal 18 dias pós-imunização, cauda com perda total do tônus; C: animal 22 dias pós- imunização, cauda com perda total de tônus e paresia das patas posteriores; E: animal 27 dias pós-imunização, cauda com perda total de tônus e patas posteriores paralisadas. Imagem obtida pela autora.

1.1.7 Terapias imunomoduladoras na EM

A EM é uma doença neurodegenerativa permanente sem cura, exigindo cuidados importantes na escolha terapêutica para proporcionar ao paciente segurança de longo prazo e tolerabilidade ao tratamento (DU PASQUIER, PINSCHOWER e MERKLER, 2014). O uso dessas

terapias tem por objetivo reduzir a frequência e duração dos surtos, como também proporcionar alívio dos sintomas para os pacientes com EM (CREE, 2007). Com o avanço no conhecimento sobre a patogênese da EM ao longo dos anos, aumentou-se o desenvolvimento de novas terapias cujo principal alvo de ação é o sistema imunológico.

Comumente, altas doses de glicocorticoides são utilizadas para atenuar a exacerbação de sintomas de curta duração (BRUSAFERRI e CANDELISE, 2000), uma vez que possuem rápido início de ação e poucos efeitos adversos (BECK *et al.*, 1993; BRUNTON, 2005). Entretanto, a primeira linha de terapias aprovada para a EM foram o Interferon β (IFN β) e acetato de glatiramer (comercialmente conhecido como Copaxone) (GOLDENBERG, 2012; ONTANEDA, HYLAND e COHEN, 2012).

IFNs β são citocinas naturalmente secretadas por células do sistema imunológico que inibem a replicação viral por atividades imunomoduladoras e antivirais (CREE, 2007). Dentre as atividades sugeridas estão indução de células Treg e inibição do tráfego de células T aos focos inflamatórios (STUVE *et al.*, 1996; DHIB-JALBUT e MARKS, 2010). Atualmente, existem quatro apresentações de IFNs β no mercado farmacêutico: Avonex® (Biogen Idec), Rebif® (Pfizer), Betaseron® (Bayer) e Extavia® (Novartis) (GOLDENBERG, 2012). Já o Acetato de Glatiramer (GA) consiste da mistura heterogênea de polipeptídios (ácido-L-glutâmico, L-lisina, L-alanina e L-tirosina) sintetizada a fim de mimetizar a MBP (CREE, 2007). Porém, após a sua síntese ficou evidenciado que o GA era capaz de modificar o perfil das células T, de pró-inflamatória para anti-inflamatória (KALA, MIRAVALLE e VOLLMER, 2011).

Outros medicamentos de administração intravenosa, além do GA e IFNs β , surgiram nos anos seguintes. O Mitoxantrone, aprovado para uso na EM no ano 2000, é um antineoplásico sintético, anteriormente, utilizado para tratamento de câncer (FDA, 2010a). Acredita-se que o mecanismo de ação deste composto seja inibir a proliferação de linfócitos T e B, assim como de macrófagos (FDA, 2010a), além de diminuir a secreção de mediadores pró-inflamatórios (MORRISSEY, LE PAGE e EDAN, 2005). Quanto aos anticorpos monoclonais, tem-se o Natalizumab (Tysabri®, Biogen) (FDA, 2012), que pela ligação específica às integrinas presentes na membrana de leucócitos, impedem os mesmos de se ligarem às moléculas de adesão VCAM-1 (RICE, HARTUNG e CALABRESI, 2005); e o Alemtuzumab, cujo alvo específico é a proteína CD52 predominante nas células T e B, o qual

provoca depleção na população de linfócitos (COX *et al.*, 2005; DU PASQUIER, PINSCHOWER e MERKLER, 2014).

Apenas recentemente surgiram as terapias orais para o tratamento da EM, sendo o Fingolimod, o primeiro medicamento aprovado para o tratamento da EMSR no ano de 2010 (FDA, 2010b). Fingolimod atua promovendo a internalização dos receptores de esfingosina 1-fosfato presentes nos linfócitos (BRINKMANN, 2009), o que impede sua migração dos linfonodos para a circulação sanguínea e, conseqüentemente, para os demais tecidos, incluindo o SNC (CHUN e HARTUNG, 2010). Em 2012, aprovou-se o uso do Teriflunomid® (SANOFI, 2012), cuja ação sugerida é o efeito citostático sobre células B e T, através da inibição da enzima mitocondrial diidroorotato desidrogenase (CHERWINSKI *et al.*, 1995). Além disso, o Teriflunomid® é capaz de interferir na interação entre APCs e linfócitos T (XU *et al.*, 1997). O Dimetil fumarato (DMF), um metil éster do ácido fumárico, tem como mecanismo proposto a citoproteção por meio da via de transcrição do fator nuclear Nrf2 (LINKER *et al.*, 2011). Dentre os efeitos imunossupressores do DMF, aponta-se a indução de mediadores anti-inflamatórios (LEHMANN *et al.*, 2007), a inibição da translocação nuclear do NF- κ B (fator nuclear kappa B) (MOHARREGH-KHIABANI *et al.*, 2010) e a redução da expressão de moléculas de adesão (VANDERMEEREN *et al.*, 1997).

Aprovado como terapia adjuvante no tratamento da EM, o Sativex® é um derivado canabinoide com ação eficaz na dor neuropática (ROG, NURMIKKO e YOUNG, 2007; LANGFORD *et al.*, 2013) e nos espasmos musculares decorrentes da doença (WADE *et al.*, 2006; COLLIN *et al.*, 2007). O medicamento é composto por delta 9-tetrahidrocanabinol (Δ 9-THC) e canabidiol (CBD), cuja formulação após ser liberada por meio de spray oral atua modulando o sistema endocanabinoide (MORENO TORRES, SANCHEZ e GARCIA-MERINO, 2014). Com o avanço na pesquisa, demonstraram-se maiores envolvimento dos receptores canabinoides no modelo da EAE, cuja ativação proporciona efeitos imunomoduladores inibindo a neuroinflamação provocada pela EM (MARESZ *et al.*, 2007; PALAZUELOS *et al.*, 2008; KONG *et al.*, 2014).

Atualmente, algumas terapias se encontram em fases clínicas finais de desenvolvimento. Por exemplo, o Laquinimod é um composto sintético estudado para uma possível terapia oral da EM, porém possui altos riscos de cardiotoxicidade (DU PASQUIER, PINSCHOWER e MERKLER, 2014). O provável mecanismo de ação proposto para o Laquinimod é a mudança no perfil de células Th1 para Th2, além da

inibição da infiltração de células inflamatórias para o SNC (YANG *et al.*, 2004). Ademais, dois novos anticorpos monoclonais injetáveis se encontram em fases finais de testes clínicos, Daclizumab e Ocrelizumab, tendo como alvos células T e células B, respectivamente (GLENNIE *et al.*, 2007; MILO, 2014).

Assim, todos os medicamentos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) tem demonstrado redução dos surtos, assim como da exacerbação dos sintomas e do surgimento de novas lesões no SNC (CHERWINSKI *et al.*, 1995; DHIB-JALBUT e MARKS, 2010). No entanto, trata-se de ações parcialmente efetivas acompanhadas de inúmeras reações adversas para o paciente (MORRISSEY, LE PAGE e EDAN, 2005; SCHREMPF e ZIEMSEN, 2007; FDA, 2013). Além disso, a EM traz consigo um fardo socioeconômico para o paciente e para a sociedade, devido aos déficits locomotores gerados e os altos custos dos medicamentos disponíveis na clínica (NACI *et al.*, 2010; PIKE *et al.*, 2012). Assim, a busca por terapias efetivas e preventivas para a EM permanece imprescindível, além de proporcionar menores custos e melhor QV ao paciente.

1.2 O SISTEMA PURINÉRGICO

O sistema purinérgico é composto, principalmente, por purinas extracelulares, tais como a adenosina, o difosfato de adenosina (ADP) e o trifosfato de adenosina (ATP), sendo o ATP o principal precursor de outros metabólitos neste sistema (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998). No meio intracelular, a enzima ATPase pode converter o ATP em monofosfato de adenosina (AMP) de forma que a enzima adenilato cinase é capaz de realizar a conversão reversa (AMP em ATP) (SAWYNOK e LIU, 2003). O AMP, por sua vez, pode ser convertido em adenosina pela ação da enzima intracelular 5-endonucleotidase (ZIMMERMANN *et al.*, 1998). Nesse contexto, tanto a adenosina quanto o ATP, ao serem transportadas para o meio extracelular, podem sofrer ação de outras enzimas. Em condições fisiológicas, a enzima ecto-5-nucleotidase (NT5E) é responsável por converter o ATP em adenosina pelo metabolismo de nucleotídeos, enquanto a adenosina deaminase (ADA) é responsável pela conversão da adenosina em inosina, o que pode ocorrer no meio intra e/ou extracelular (Figura 6) (SAWYNOK e LIU, 2003; HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004).

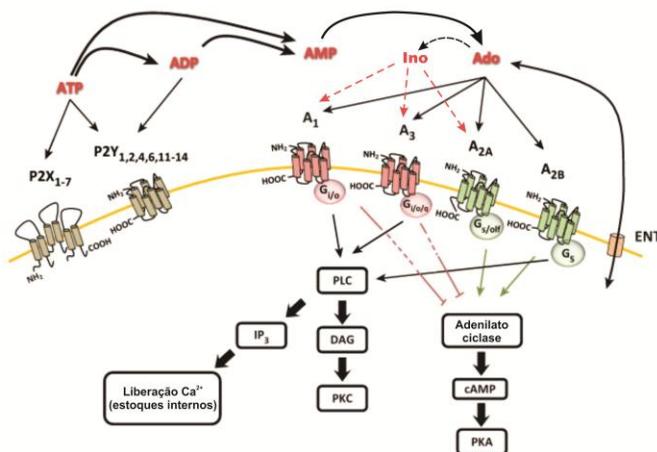


Figura 6: Metabolismo extracelular do ATP, receptores purinérgicos P1 e P2, e vias de sinalização dos receptores adenosinérgicos (A1, A2A, A2B e A3). Esquema do metabolismo extracelular de ATP em ADP, AMP, Ado e Ino; receptores purinérgicos P1 e P2; e via de sinalização desses moduladores. ATP e ADP se ligam a receptores P2, enquanto que Ado liga-se à receptores P1 (A1, A2A, A2B e A3), e Ino liga-se à receptores A1, A2A e A3. Os receptores A2 ativam adenilato ciclase com consequente produção de AMPc e fosforilação de PKA. Os receptores A1, A2B e A3 ativam PLC seguida da produção de segundos mensageiros IP₃ e DAG. ATP: adenosina trifosfato, ADP: adenosina difosfato, AMP: adenosina monofosfato, Ado: adenosina, Ino: inosina, PLC: fosfolipase C, IP₃: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína cinase C, AMPc: adenosina monofosfato cíclico, PKA: proteína cinase A. Fonte: Adaptado de Dias *et al.*, (2013).

Na década de 70, Burnstock (1972) estabeleceu o conceito da neurotransmissão purinérgica, baseado em evidências da atuação do ATP como neurotransmissor em neurônios não adrenérgicos e não colinérgicos, sendo hoje reconhecido como um co-transmissor de neurônios do SNC e SNP (BURNSTOCK, 2006). O sistema purinérgico contém receptores do tipo P1 e P2, ativados respectivamente pela adenosina e ATP, os principais agonistas endógenos do sistema. Posteriormente, a classe de receptores P2 foi subdividida em P2X e P2Y, assim como P1 em sub-tipos A1, A2A, A2B e A3 (BURNSTOCK, 2007; MATUTE e CAVALIERE, 2011).

1.3 INOSINA

A inosina, um nucleosídeo de purina, é o primeiro metabólito da adenosina formada pela ação da enzima ADA, tanto no meio intra quanto extracelular, de baixo peso molecular, que por degradação pode gerar hipoxantinas e ácido úrico (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004). A inosina tem sido comercializada como suplemento energético para atletas, com o objetivo de aumentar a *performance* durante os treinos e/ou competições, no entanto, pesquisas realizadas com esportistas não encontraram efeito benéfico adicional nos usuários de inosina como suplemento (STARLING *et al.*, 1996b); (MCNAUGHTON, DALTON e TARR, 1999).

Anteriormente, a comunidade científica acreditava que a inosina era um produto inativo da adenosina isenta de ações fisiológicas. No entanto, os primeiros estudos demonstraram o envolvimento da inosina nas contrações musculares, durante as quais a inosina-tri-fosfato era defosforilada em maiores proporções que o ATP pela miosina (KLEINZELLER, 1942). Posteriormente, verificou-se a ação da inosina no sistema cardiovascular, no qual se pode observar, além da atividade cardioestimulatória, ação moduladora dos receptores β -adrenérgicos (JUHASZNAGY e AVIADO, 1977).

O avanço nas pesquisas ao longo dos anos permitiu que novas propriedades fisiológicas da inosina fossem reveladas à ciência. Observou-se que neurônios contralaterais ao córtex lesionado, em ratos adultos induzidos ao infarto cortical unilateral, foram capazes de gerar novas projeções axonais para a área infartada sob o estímulo da inosina, com consequente melhora do déficit sensoriomotor (CHEN *et al.*, 2002). Posteriormente, a indução da regeneração axonal pela inosina foi relatada em células ganglionares da retina de ratos axotomizadas (WU *et al.*, 2003). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a inosina foi capaz de induzir aumento na viabilidade celular e no crescimento de neuritos após dano isquêmico (TOMASELLI *et al.*, 2005). Estudos mais recentes têm revelado atividades neuroprotetoras da inosina, as quais dão suporte àquelas sugeridas nos estudos anteriores. Assim, verificou-se que a inosina induz aumento da expressão de genes relacionados ao crescimento axonal (ZAI *et al.*, 2009), além de proporcionar plasticidade neuronal com formação de circuitos compensatórios e consequente melhora da coordenação locomotora *in vivo* (KIM *et al.*, 2013; KURICOVA *et al.*, 2014).

Além dos efeitos neuroprotetores, estudos descreveram o papel imunomodulador da inosina. Dados obtidos *in vitro* da imunoestimulação de macrófagos peritoneais demonstraram que a inosina foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais

como TNF- α , IL-1 e IL-12, assim como a produção de IFN- γ por linfócitos do baço (HASKO *et al.*, 2000). Posteriormente, estudo *in vitro* realizado com células humanas demonstrou ação inibitória da inosina na produção de TNF- α por monócitos, neutrófilos e células epiteliais estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (MARTON *et al.*, 2001). Recentemente, através de estudo em modelo animal de asma, cuja imunopatologia envolve principalmente ativação de células Th2, o tratamento com inosina intraperitoneal proporcionou níveis reduzidos de linfócitos e macrófagos no lavado broncoalveolar (DA ROCHA LAPA *et al.*, 2013).

Ainda nesse contexto, os efeitos anti-hiperalgésicos da inosina foram obtidos em estudo de Nascimento e colaboradores (2010) utilizando diferentes modelos animais de dor aguda, como os modelos do ácido acético, glutamato e formalina. Neste mesmo trabalho, demonstraram a redução da hiperalgesia mecânica e térmica no modelo de dor neuropática, além do bloqueio da hiperalgesia mecânica no modelo de dor crônica inflamatória, ambos obtidos via tratamento com inosina.

Publicações mais recentes sugerem a importância da inosina como alvo de interesse para estudos de depressão e doença de Parkinson (DP) (MARKVARDSEN *et al.*). Através de modelos animais distintos de depressão, tais como o estresse crônico forçado e o estresse por derrota social crônica, Muto e colaboradores (2014) demonstraram o efeito antidepressivo do tratamento oral com inosina (200mg/kg). Com relação à DP, verificou-se a função protetora da inosina em modelo *in vitro* proporcionado pelo aumento da viabilidade celular associada à redução do estresse oxidativo e à degradação proteica (CIPRIANI, BAKSHI e SCHWARZSCHILD, 2014).

Estudos provenientes das pesquisas supracitadas demonstram atualmente que a inosina exerce um forte papel imunomodulador, neuroprotetor e anti-hiperalgésico. Além disso, acredita-se que esses efeitos promovidos pela inosina sejam mediados pela ativação de receptores adenosinérgicos A1, A2A e A3. No entanto, alterações nas funções celulares por vias independentes de receptores podem ser oriundas dos efeitos induzidos pelo seu metabólito, o ácido úrico (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004).

1.4 RECEPTORES DE ADENOSINA E INOSINA

Particularmente, os quatro sub-tipos de receptores adenosinérgicos (A1, A2A, A2B e A3) estão acoplados à diferentes

proteínas G, podendo ativar vias distintas de sinalização resultando em ações fisiológicas diversas (FREDHOLM *et al.*, 2001). Os receptores A1 e A3 estão acoplados a proteínas G inibitória (Gi e Go), enquanto o A2AR à proteína G estimulatória (Gs) ou à proteína Golf, e o A2BR às proteínas Gs e Gq (LINDEN, 2001).

No SNC, o receptor A1 (A1R) é encontrado em alta densidade no hipocampo, neocórtex, cerebelo e corno dorsal da medula espinhal, assim como no tálamo, tronco encefálico e outras regiões centrais (SEBASTIAO e RIBEIRO, 2009). O A1R pode ser expresso tanto em neurônios pré como pós-sinápticos, estando presentes ainda na microglia (STONE, CERUTI e ABBRACCHIO, 2009). Durante a ativação do receptor A1R, ocorre inibição da enzima adenilato ciclase (AC) com consequente redução do segundo mensageiro AMPc (adenosina monofosfato cíclico) (LINDEN, 2001), ativação de canais de potássio (MATSUMOTO, KOMIYAMA e AKAIKE, 2002) e/ou inibição de canais de cálcio (PARK *et al.*, 2001). A supressão da liberação de neurotransmissores excitatórios nos terminais sinápticos, tal como o glutamato, também é uma consequência da ativação do receptor A1 (STONE, CERUTI e ABBRACCHIO, 2009).

Por outro lado, o receptor A2A (A2AR) distribui-se regularmente no SNC e SNP com expressão preferencial no estriado (DIXON *et al.*, 1996; RALEVIC e BURNSTOCK, 1998), podendo ser encontrado em tecidos imunológicos (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004). Quanto ao receptor A2B (A2BR), é relativamente bem distribuído no SNC e SNP, apresentando alta densidade apenas no intestino e na bexiga (STONE, CERUTI e ABBRACCHIO, 2009). Ambos os receptores A2A e A2B ativam a via da AC gerando aumento na produção de AMPc, o qual estimula a proteína cinase A (PKA) AMPc-dependente, com consequente ativação de canais de cálcio e potássio (RIBEIRO, SEBASTIAO e DE MENDONCA, 2002). Brevemente, a via de sinalização da ERK1/2 pertencente à família das MAPKs, pode ser desencadeada pela ativação de receptores A2A (GARRINGTON e JOHNSON, 1999), resultando em efeitos anti-inflamatórios (HUANG, 1997; TAN *et al.*, 1999) e/ou neuroprotetor (FYFFE-MARICICH *et al.*, 2013). A ativação de A2AR pode desencadear a inibição de ERK1/2 via PKA/Raf1 (HUANG *et al.*, 1997), enquanto a interação de A2AR com o sistema proteína Gs/AC/AMPc/RAP-1A resulta na ativação da proteína cinase ativada por mitógenos 1-3 (ERK1/2), independente da proteína cinase A (PKA) (WYATT *et al.*, 2002).

Em contrapartida, o receptor A3R é encontrado em tecidos periféricos e possui baixa expressão em quase todo o encéfalo, porém

com nível aparentemente maior no cerebelo e hipocampo (SEBASTIAO e RIBEIRO, 2009). Sua estrutura acopla-se à proteína Gi/0 e Gq/11, e tem como principal ação a inibição da enzima AC, aparentemente do mesmo modo que o A1R (LINDEN, 2001).

1.5 EM E INOSINA

Ao buscar na literatura, verifica-se a escassez de dados dos possíveis efeitos protetores da inosina sobre os eventos desencadeados na EM, assim como dos prováveis mecanismos de ação envolvidos. Os primeiros estudos surgiram com o produto final do metabolismo das purinas, o ácido úrico, um potente antioxidante endógeno (WHITEMAN e HALLIWELL, 1996). Baseando-se na correlação existente entre a produção de radicais livres no SNC e o desenvolvimento dos sinais clínicos no modelo da EAE (HOOPER *et al.*, 1997), estudos prévios demonstraram a eficácia do ácido úrico de modo preventivo e terapêutico em inibir a evolução da EM. Enquanto na clínica, observou-se baixos níveis séricos de ácido úrico em pacientes com EM, o que favorece ao aumento da susceptibilidade aos danos progressivos no SNC (HOOPER *et al.*, 1997; 1998; TONCEV, 2006). Posteriormente, a administração oral do ácido úrico e do seu precursor, inosina, foi capaz de proporcionar uma melhora clínica nos pacientes com EM crônica (SPITSIN *et al.*, 2001; TONCEV, 2006).

No entanto, nota-se que, até os dias atuais, os dados obtidos de estudos sobre o tratamento da EM com inosina são superficiais, pois revelam basicamente a melhora de escores clínicos, sugerindo boa tolerabilidade e segurança da terapia (SPITSIN *et al.*, 2001; TONCEV, 2006; MARKOWITZ *et al.*, 2009). Em contrapartida, uma variedade de estudos correlacionando os receptores adenosinérgicos e modelos de EM surgiram ao longo dos anos, partindo da premissa que, a adenosina possui papel imunomodulador e neuroprotetor (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004; TSUTSUI *et al.*, 2004; MILLS *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2012; MECHA *et al.*, 2013; RISSANEN *et al.*, 2013).

A fim de verificar a participação específica do receptor A1 na EM, Tsutsui e colaboradores (2004) revelaram que animais com deleção gênica (nocautes) para este receptor desenvolvem a EAE com maior severidade, além de debilidades neurológicas cumulativas. Esses resultados foram complementados ao observar maior ativação da microglia, aumento na desmielinização e perda axonal. A ausência de A1R ainda alterou as respostas imunológicas no SNC de animais com EAE, contribuindo para o aumento na expressão de mediadores

inflamatórios e redução de citocinas anti-inflamatórias (TSUTSUI *et al.*, 2004). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que a melhora do neurocomportamento com reduzida neuropatologia em animais EAE, decorrentes do tratamento com glicocorticoide, envolveu o aumento da expressão de A1R (TSUTSUI *et al.*, 2008).

De forma semelhante, estudo conduzido por Yao e colaboradores (2012) utilizando camundongos nocautes para o A2AR demonstraram uma incidência elevada de animais com EAE, além da exacerbação dos escores clínicos. O déficit neurocomportamental agravado é seguido de eventos imunopatológicos característicos da EM, além da ativação glial, ambos acentuados. Ademais, a inativação do A2AR provocou o aumento de células CD4⁺ em órgão linfoide periférico (YAO *et al.*, 2012). Dados posteriores *in vivo* revelam que agonistas seletivos e não seletivos de receptores A2A inibem o desenvolvimento da EAE e provocam redução de escores clínicos. Em complemento, análises *in vitro* da ação dos agonistas A2A revelaram produção diminuída de mediadores inflamatórios (XU *et al.*, 2013). Além da EAE, estudo realizado no modelo de EM induzida por infecção viral (*Theiler's virus infection*) sugere que as atividades imunoregulatórias obtidas com canabinoides não psicotrópicos *in vivo* e *in vitro* são mediadas, em parte, pelo receptor adenosinérgico A2A (MECHA *et al.*, 2013).

Paralelamente, pesquisas *in vitro* realizadas por Vincenzi e colaboradores (2013) com células humanas obtidas de pacientes com EM suportam as ações agonistas do A2AR. Observou-se nesse experimento uma inibição na proliferação de linfócitos, bem como na secreção de mediadores pró-inflamatórios (IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6) e na expressão de moléculas de adesão/junção relacionadas à permeabilidade da BHE. Os resultados obtidos com o agonista foram revertidos pelo antagonista seletivo de A2AR, o que revela ações mediadas especificamente pelo receptor A2A.

Neste contexto, suscitamos a hipótese de que a inosina seja capaz de inibir o desenvolvimento e a progressão da EAE em camundongos C57BL/6, através da modulação dos receptores adenosinérgicos no SNC.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação anti-hiperalgésica, imunomoduladora e neuroprotetora da inosina no modelo experimental de EM em camundongos C57BL/6, através de estudos comportamentais, assim como técnicas farmacológicas, bioquímicas e imunológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da inosina no escore clínico, assim como sobre a hiperalgesia mecânica e térmica que precedem a disfunção motora induzida pela EAE;
2. Avaliar o efeito da inosina sobre os comportamentos de exaustão (fadiga), tipo-depressivo e ansioso na fase pré-sintomática da EAE;
3. Avaliar o papel da inosina durante a resposta neuroinflamatória induzida pela EAE;
4. Avaliar o efeito da inosina sobre o grau de desmielinização no SNC após a indução da EAE;
5. Avaliar o efeito do tratamento com a inosina na ativação de células gliais, tais como os astrócitos, durante o desenvolvimento da EAE;
6. Investigar a ação da inosina sobre a expressão dos receptores adenosinérgicos A1 e A2A, assim como na expressão da enzima *extracelular signal-regulated kinase 1* (ERK1) durante a progressão da EAE;
7. Avaliar o efeito anti-inflamatório da inosina no SNC e imunomodulador sobre o nível de IL-17 nos linfonodos inguinais após o desenvolvimento da EAE.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos C57BL/6, fêmeas, com idade de 6 – 12 semanas, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX), Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC). Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos em caixas plásticas no número de 5 a 6 em câmaras com sistema de circulação de ar controlado, sob condições de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) 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 (6 - 18 horas) e os animais mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 30 minutos antes da realização dos testes comportamentais. 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, número de protocolo PP00811 e PP00956).

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA EAE E TRATAMENTO COM INOSINA

A EAE foi induzida pela inoculação de 200 μL de emulsão contendo 200 μg de glicoproteína de mielina do oligodendrócitos (MOG35-55), em adjuvante completo de Freund (CFA), suplementado com 500 μg de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) H37Ra (Difco, Detroit, MI, USA), em ambos os lados dos flancos traseiros. Este procedimento foi repetido após sete dias a fim de aumentar a incidência de EAE, conforme metodologia descrita anteriormente (STROMNES e GOVERMAN, 2006a). Além disso, cada animal recebeu 300 ng de Bordetella toxina Pertussis em 200 μL de solução salina por via intraperitoneal (i.p.) no dia 0 e dia 2 pós-imunização (p.i.). No período de 40 dias (dia 0 ao dia 40 p.i.), os animais foram tratados pela via i.p., duas vezes ao dia, com inosina (1 ou 10 mg/kg) ou solução salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg). As doses e tempos de tratamento da inosina foram baseados em experimentos pilotos ou em trabalhos previamente publicados pelo grupo (NASCIMENTO *et al.*, 2010; 2014). Paralelamente, realizou-se a avaliação diária do peso e dos sinais

clínicos dos animais, a fim de verificar o surgimento dos sintomas típicos da doença determinados por estágios, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento da EAE.

Escore	Sinais clínicos	Observações
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.

Fonte: Adaptado de Stromnes e Goverman (2006a)

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram realizados no período que precede o estabelecimento da EAE, ou seja, do 1° ao 14° dia p.i., uma vez que o déficit locomotor apresentado pelos animais com EAE após este período impossibilita a análise desses parâmetros. Os dados comportamentais obtidos se referem a dois experimentos independentes. Primeiramente, avaliou-se o efeito da inosina nas doses de 1 e 10mg/kg

na hiperalgesia mecânica e térmica ao frio. Visto que o tratamento com a dose de 1mg/kg demonstrou-se mais eficaz, juntamente com os resultados das análises imunológicas, os demais testes comportamentais foram realizados apenas com inosina 1mg/kg.

3.3.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica

O desenvolvimento da hiperalgesia mecânica foi avaliado utilizando-se filamentos de von Frey pelo método de frequência de retirada (BORTALANZA *et al.*, 2002). Os animais foram alocados 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). Para determinar o limiar basal, todos os grupos (controle, EAE + veículo, EAE + inosina 1 mg/kg e EAE + inosina 10 mg/kg) foram avaliados antes da indução da doença. A avaliação da hiperalgesia mecânica seguiu-se com todos os grupos em dias alternados, com início no 2º dia até o 14º p.i.

3.3.2 Avaliação da hiperalgesia térmica ao frio

Para a avaliação da hiperalgesia térmica ao frio, utilizou-se o método da acetona adaptado (WALCZAK e BEAULIEU, 2006). Os camundongos foram alocados em compartimentos de acrílico transparente (9 x 7 x 11 cm) com plataformas de arame elevadas e aclimatizados durante 30 minutos. Após a aplicação de um borrifo de 20 µL de acetona na pata direita traseira do animal, a resposta foi avaliada cronometrando-se o tempo em que o animal recolheu, sacodiu, lambeu ou mordeu a pata no período de 20 segundos após o estímulo nocivo. Foram realizadas três medidas do tempo de resposta, registradas em intervalos de aproximadamente 15 minutos. A fim de determinar o limiar basal, todos os grupos (controle, EAE + veículo, EAE + inosina 1 mg/kg e EAE + inosina 10 mg/kg) foram avaliados antes da indução da doença. A avaliação da hiperalgesia térmica seguiu-se com todos os grupos em dias alternados, com início no 1º dia até o 13º dia p.i.

3.3.3 Teste de consumo de sacarose (TCS)

A fim de avaliar possíveis alterações anedônicas, prosseguiu-se com a realização do teste da ingestão de solução de sacarose (WEISS, 1997) no 10° e 11° dia p.i. com os grupos controle, EAE + veículo e EAE + inosina 1 mg/kg, conforme metodologia descrita previamente por Takatsu-Coleman e colaboradores (2013). Antes de iniciar o TCS, os camundongos foram habituados durante 24 horas em caixas individuais com duas garrafas de água. Após esse período, uma das garrafas foi preenchida com água e outra com solução contendo 1% de sacarose. As garrafas foram pesadas e recolocadas nas caixas individualizadas por 48 horas. Com a finalidade de prevenir um possível efeito de preferência por alguns dos lados da caixa, as garrafas foram invertidas após um período de 24 horas. O consumo de sacarose foi calculado como a porcentagem de consumo da solução de sacarose em relação ao total de líquido consumido (água + sacarose). Ao final do teste, todos os animais foram novamente agrupados em suas respectivas caixas com livre acesso à água e ração.

3.3.4 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste no labirinto em cruz elevado, método validado para camundongos por Lister (1987), foi utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais controle, EAE + veículo e EAE + inosina 1 mg/kg no 12° p.i. O aparato consiste de dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), conectados por uma plataforma central (5 x 5), sendo elevado a 75 cm do chão. Cada animal foi colocado no centro do labirinto em cruz com a face voltada para um dos braços fechados, permitindo-o livre exploração por 5 minutos. O teste ocorreu na ausência do experimentador sendo filmado para posterior análise. Avaliou-se o tempo gasto em cada braço e o número de entradas, considerando-se uma entrada completa quando o animal adentrou com as quatro patas no braço. O labirinto em cruz elevado foi limpo com álcool 30% a cada troca de animal.

3.3.5 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

No dia 13 p.i., os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda, a fim de analisar o comportamento tipo-depressivo seguindo o método de Can e colaboradores (2012), com algumas adaptações. Primeiramente, na cauda de cada animal foi colocado um cilindro plástico transparente (4 x 1 cm) para evitar o comportamento de escalada pela cauda natural de camundongos C57BL/6. Em seguida, um

cuta de fita adesiva de aproximadamente 17 cm foi presa na ponta da cauda do animal. Uma vez colocada a fita, esta foi fixada em sua metade na parede interior da caixa do animal. Posteriormente, os animais foram suspensos pela extremidade livre da fita à extremidade da bancada, com um comprimento semelhante de folga para todos os animais. Para evitar qualquer interação entre os animais, divisórias de isopor foram colocadas equidistantes entre os mesmos. O teste procedeu-se em grupo de três animais, sendo filmado para posterior avaliação do tempo de imobilização dos animais. Ao final de cada filmagem, retirou-se a fita e o cilindro do animal, cuidadosamente, retornando-o para sua respectiva caixa.

3.3.6 Teste do nado forçado com sobrecarga (WLST)

O teste do nado forçado com peso procedeu-se no dia 14 p.i. com os grupos controle, EAE + veículo e EAE + inosina 1 mg/kg, a fim de avaliar a fadiga nos animais. O protocolo utilizado para esse teste foi adaptado de Su e colaboradores (SU *et al.*, 2014). Um peso de metal de aproximadamente 5% do peso corporal do camundongo foi preso à base de sua cauda com fita impermeável. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em tubos de PVC (altura 24 cm, diâmetro 10 cm), cuja uma das bordas é fechada, com 40 cm de água a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. O período de nado foi marcado do tempo em que o animal é colocado na água até sua exaustão (submersão por 7 segundos sem conseguir voltar à superfície) por no máximo 30 minutos. Anteriormente à indução da EAE foi realizado teste basal com todos os animais.

3.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

A análise histológica na medula espinhal dos animais ocorreu conforme descrito anteriormente (DUTRA *et al.*, 2011). Decorrido 40 dias após a imunização, os animais foram eutanizados e a medula da região lombar foi coletada por secções transversais, seguida da 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-trietoxissilano; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona (v/v). Posteriormente, as lâminas de vidro contendo os cortes histológicos foram mantidas em estufa, durante 1 hora, a uma temperatura de aproximadamente 50°C , para fixação dos mesmos. 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. Os resultados foram documentados utilizando câmera digital colorida com 3.3 mpxel da Q-imaging pelo programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 da Q-image acopladas a um microscópio Olympus Bx41. Para análise da reação de coloração, foram obtidas 5-6 imagens com aumento de 100x e 400x por corte histológico de 3-4 animais/grupo. A densidade óptica que melhor discriminou as reações de coloração foi obtida utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear das células inflamatórias (H&E-violeta) ou da área de mielina (LFB-azul). A intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como densidade óptica (DO).

3.5 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A análise imunoistoquímica na medula espinhal dos animais seguiu conforme descrito anteriormente (DUTRA *et al.*, 2011). A coleta de tecido medular e a preparação das lâminas procederam-se conforme descrito no item anterior. Para a realização da análise imunoistoquímica, as lâminas fixadas foram desparafinizadas através de imersões consecutivas em xilol e re-hidratadas por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (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 minutos. 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. Desse modo, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 durante 40 minutos, em banho-maria com temperatura ajustada para 95–98°C. Logo após, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente e lavada em água destilada e solução tampão fosfato (PBS) para concluir o processo térmico de reativação antigênica. Anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) foi utilizado como anticorpo primário e mantido sob as lâminas em câmara úmida overnight, 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 biotilado anti-IgG de coelho (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) em câmara úmida durante 60 minutos à

temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e a imunodeteção foi completada utilizando-se solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydrocloroto) (DAB, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Em seguida, foi realizada a contracoloração das secções histológicas em solução de hematoxilina de Harris, desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% de etanol), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente (Entellan, Merck, Frankfurt, Darmstadt, Germany). Os resultados foram documentados utilizando câmera digital colorida com 3.3 mpixel da Q-imaging pelo programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging acoplada a um microscópio Olympus Bx41. Para análise da reação antígeno-anticorpo, foram obtidas 5-6 imagens a partir dos cortes histológicos da medula espinhal de cada animal. A densidade óptica que melhor discriminou a imunomarcção (coloração castanha) foi obtida utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b. Para a análise dos níveis de GFAP, a intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como DO.

3.6 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA IL-17

Para análise da citocina IL-17 foram utilizados linfonodos coletados dos animais do grupo controle, EAE + veículo, EAE + inosina 1 mg/kg e EAE + inosina 10 mg/kg. Após a dissecação as amostras foram colocadas em tampão fosfato (PBS) contendo: tween 20 (0,05 %), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) (0,1 mM), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzametônio (0,1 mM) para a homogeneização. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos (4° C) e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80° C, para a futura análise. O conteúdo proteico total foi mensurado do sobrenadante pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Aliquotas de 100 µL foram utilizadas para mensurar os níveis da citocina IL-17 (DY421) através de kits de ELISA DuoSet para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com instruções do fabricante. O nível da citocina foi mensurado pela interpolação de uma curva padrão por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) em um leitor de

placas (Berthold Technologies, Apollo 8 – LB 912, KG, Alemanha) e os valores finais foram expressos como pg/mg de proteína.

3.7 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*

O Western blotting foi executado conforme descrito previamente (LEAL et al., 2002). Decorrido 40 dias após a imunização, os animais foram eutanizados, a medula espinhal foi removida e rapidamente congelada em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenada a -80°C até o dia da análise. As amostras foram preparadas conforme descrito previamente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Brevemente, os tecidos medulares foram homogeneizados mecanicamente em 400 µL de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases). O material foi, posteriormente, centrifugado (10.000 x g por 10 minutos, a 4°C) para a eliminação de restos celulares, e o sobrenadante (300 µL) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8%) e aquecido a 100°C por 5 minutos. Após homogeneização, uma alíquota da amostra foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se à amostra a solução de diluição (glicerol 40%, Tris 25mM e azul de bromofenol, pH 6,8) numa proporção de 25:100 (v/v), finalizando o procedimento com adição de β-mercaptoetanol 8%. Por meio do método descrito por Peterson (1977) estimou-se o teor e a concentração proteica a partir da curva padrão de albumina bovina. As proteínas (50 µg de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 10-12% acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado diluído em 10 mL de tampão salina Tris (TBS) 5% (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). O imunocontéudo de A1R e A2AR, assim como as formas total e fosforilada de ERK foram detectadas com o uso de anticorpos específicos anti-A1R (Abcam, ab82477, 36 kDa) e anti-A2AR (Santa Cruz Biotechnology, sc-32261, 45 kDa), anti-ERK (Cell Signaling®, sc-93, 44 kDa) e anti-pERK (Cell Signaling®, sc-7976, 44 kDa), diluídos em tampão salina Tris com tween (TBS-T) contendo BSA (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween- 20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5) na diluição 1:250. As membranas foram incubadas com o anticorpo de

interesse overnight a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, anti-rabbit para A1R e ERK1 ou anti-goat para A2AR e p-ERK1, conjugado com peroxidase (1:1000 anti-goat e 1:250 anti-rabbit) e a imunorreatividade das bandas revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA), segundo especificações do fabricante e com o uso do equipamento de revelação Chemidoc® (Bio-Rad 79 Laboratories). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens das membranas (5 minutos cada) com TBS-T. A fim de se detectar as formas fosforilada e total de ERK na mesma membrana, os imunocomplexos foram removidos conforme descrito previamente (POSSER *et al.*, 2007). De forma simplificada, as membranas foram lavadas uma vez com água duplamente deionizada (5 minutos), em seguida foram incubadas com NaOH 0,2 M (5 minutos), lavadas com água duplamente deionizada (5 minutos) e por último com TBS-T (5 minutos). As membranas desprovidas de imunocomplexos foram bloqueadas e submetidas ao mesmo protocolo descrito acima. A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando Image Lab software® 4.1 (Bio-Rad Laboratories). As bandas de proteínas foram quantificadas por densitometria utilizando β -actina (Abcam, 1:1000) como controle padrão da aplicação de proteínas. O nível de fosforilação da ERK (Tyr 204) foi determinado pela razão DO da proteína fosforilada/DO da proteína total normalizada pela β -actina. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

3.8 FÁRMACOS E REAGENTES

A inosina foi obtida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e diluída em solução salina isotônica (NaCl 0,9%). Para a indução da EAE, os reagentes toxina Pertussis, PBS e CFA foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA), o peptídeo MOG35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) foi obtido da EZBiolab, Carmel, IN 46032, USA e o *M. tuberculosis* H37Ra obtido da Difco Laboratories, Detroit, MI, USA. Nas análises histológicas e imunoistoquímicas, os reagentes PBS, H&E e H₂O₂ foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA), o anticorpo monoclonal de camundongo anti-GFAP da Cell Signalling Technology (Danvers, MA, EUA). Os anti-corpos para realização do *Western blot* foram adquiridos, respectivamente, anti-A2AR, anti-ERK sc-93 e anti-pERK

sc-7976 da Santa Cruz Biotechnology® , anti-A1R e β -actina da Abcam®. O nível de citocina (IL-17) foi determinado utilizando conjunto de diagnóstico de ELISA obtido da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (HAJI *et al.*, 2012). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância (MICHOT *et al.*, 2012) de uma ou duas vias, adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste post hoc de 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 Prism4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA INOSINA SOBRE OS SINAIS CLÍNICOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA EAE

Assim como ocorrem déficits motores na EM, o seu modelo EAE caracteriza-se por neurodegeneração seguida, dentre outros fatores, de paralisia da cauda e membros nos animais (STROMNES e GOVERMAN, 2006a; VAN ASCH, 2011). Desse modo, é possível acompanhar o desenvolvimento da doença pela manifestação de sinais clínicos nos animais, os quais iniciam geralmente entre os dias 9 a 14 p.i. Para avaliar a severidade clínica da EAE, assim como a ação preventiva da inosina, utilizou-se a escala de escores conforme a Tabela 1, previamente descrita. Os resultados apresentados nas Figuras 7A e 7B demonstram que os animais do grupo EAE apresentaram os primeiros sinais de paralisia no dia 12 p.i., atingindo o valor máximo de escore no dia 36 p.i. ($2,5 \pm 0,5$). De maneira relevante, o tratamento com inosina (1 e 10mg/kg) inibiu, significativamente, o surgimento dos sinais clínicos induzidos pela EAE (Figuras 7A e 7B), além de reduzir a severidade dos escores quando comparados aos animais do grupo EAE + veículo. Ressalta-se que os animais tratados com inosina na dose 1mg/kg apresentaram os primeiros sinais típicos da EAE apenas no 30º dia após a imunização, com escore clínico máximo de 1 no último dia da análise (Figura 7A) e com inibição máxima de 88% em relação ao grupo EAE + veículo, baseado no gráfico da área sob a curva (ASC) (Figura 7B). Por outro lado, embora os sinais clínicos nos animais tratados com inosina 10mg/kg tenham surgido no dia 20 p.i., o escore clínico máximo atingido também foi de apenas 1 (Figura 7A), com inibição máxima de 77% baseado no gráfico da ASC (Figura 7B).

Além dos sinais de paralisia, a perda de peso corporal é também considerada uma manifestação clínica decorrente da EAE (STROMNES e GOVERMAN, 2006a; VAN ASCH, 2011). De acordo com a Figura 7C, nos primeiros dias p.i., todos os animais apresentaram perda de peso. No entanto, no decurso da doença, pôde-se observar que os animais do grupo EAE + veículo apresentaram significativa perda de massa corporal em relação ao grupo controle (Figura 7C). Ainda, na Figura 7D observa-se que a partir da medida de ganho de peso em relação ao pico da doença (22º dia p.i.), observou-se perda de peso significativa nos animais EAE + veículo quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, o tratamento com inosina na dose de 1 mg/kg foi capaz de inibir a perda de peso induzida pela EAE (Figura 7C),

assim como restaurá-la de maneira similar aos animais do grupo controle (Figura 7D). No entanto, o tratamento com inosina na dose de 10 mg/kg falhou em inibir a perda de peso induzida pela EAE (Figuras 7C e 7D).

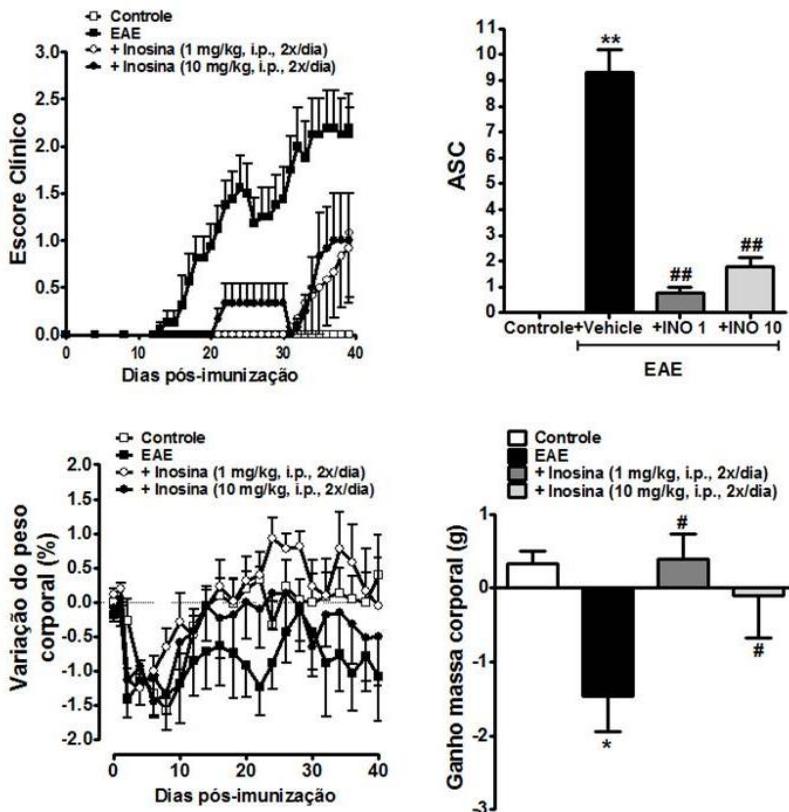


Figura 7: Efeito da inosina sobre os sinais clínicos e o desenvolvimento da EAE. Escore clínico (A), área sob a curva (ASC) (B), variação de peso corporal (C) no decurso da EAE e ganho de peso corporal no pico da doença (22º dia p.i.) (D) avaliados nos grupos controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10mg/kg (i.p.). Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ representa a diferença estatística do grupo EAE + veículo *versus* o grupo controle, # $p < 0,01$ e ## $p < 0,001$ representa a diferença estatística dos grupos EAE + inosina (1 ou 10 mg/kg) *versus* o grupo EAE + veículo (ANOVA de duas vias – A e C, ANOVA de uma via – B e D seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

4.2 EFEITO DA INOSINA SOBRE A HIPERALGESIA INDUZIDA PELA EAE

Dentre as principais manifestações clínicas associadas à EM, a dor neuropática é relativamente comum, cuja manifestação colabora de forma vigorosa para a redução na QV do paciente (GALLIEN *et al.*, 2014). Assim, o próximo objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito anti-hiperalgésico da inosina durante a fase pré-motora da EAE. Conforme ilustrado na Figura 8, a hiperalgisia mecânica induzida pela EAE foi caracterizada pelo aumento evidente e prolongado na frequência de resposta à estimulação com ambos os filamentos de von Frey utilizados (0,4 e 0,6 g). A hiperalgisia mecânica foi evidente a partir do 4º dia p.i., atingiu o pico máximo de resposta no dia 12 e permaneceu elevada durante os 14 dias de análise, principalmente na avaliação pelo filamento de von Frey 0,4 g (Figuras 8A e 8B). O tratamento preventivo dos animais com inosina na dose de 1mg/kg inibiu a hiperalgisia mecânica induzida pela EAE, com inibição máxima de $65 \pm 13\%$ e $79 \pm 10\%$, respectivamente para os filamentos 0,4 e 0,6g, baseado no gráfico da ASC (Figuras 8B e 8D). No entanto, esse efeito analgésico não foi evidenciado após o tratamento dos animais com inosina na dose de 10mg/kg (Figura 8).

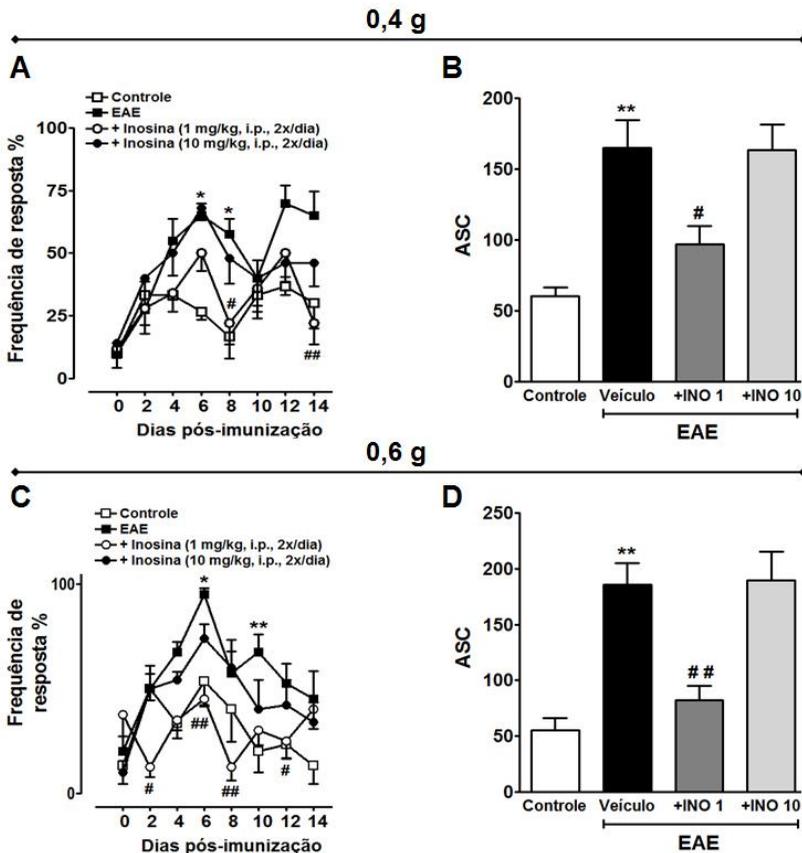


Figura 8: Efeito da inosina sobre a hiperalgesia mecânica decorrente da indução da EAE. Hiperalgesia mecânica (A e C) e área sob a curva (B e D) avaliada com filamentos de von Frey 0,4 g (A e B) e 0,6 g (C e D) nos grupos controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10mg/kg (i.p.). Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ representam a diferença estatística do grupo EAE + veículo *versus* o grupo controle, # $p < 0,01$ e ## $p < 0,001$ representam a diferença estatística dos grupos EAE + inosina (1 ou 10 mg/kg) *versus* o grupo EAE + veículo (ANOVA de duas vias – A e C, ANOVA de uma via – B e D seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Além da hiperalgesia mecânica, a dor neuropática induzida pela EAE também se manifesta através da hiperalgesia térmica. Por esta razão, o próximo objetivo desse estudo foi avaliar se o tratamento dos

animais com inosina poderia também inibir a hiperalgesia térmica ao frio induzida pela imunização com MOG₃₅₋₅₅. Conforme demonstrado na Figura 9, a EAE induziu uma acentuada e prolongada hiperalgesia térmica ao frio quando comparado ao grupo controle. Em contrapartida, o tratamento preventivo com inosina (1 e 10 mg/kg) inibiu de maneira significativa a hiperalgesia térmica ao frio, principalmente, nos dias 3, 7 e 9 p.i. (Figura 9A), com inibição máxima de $84 \pm 9\%$ e $62 \pm 12\%$, respectivamente para os tratamentos com inosina 1 e 10mg/kg, baseado no gráfico da ASC (Figura 9B).

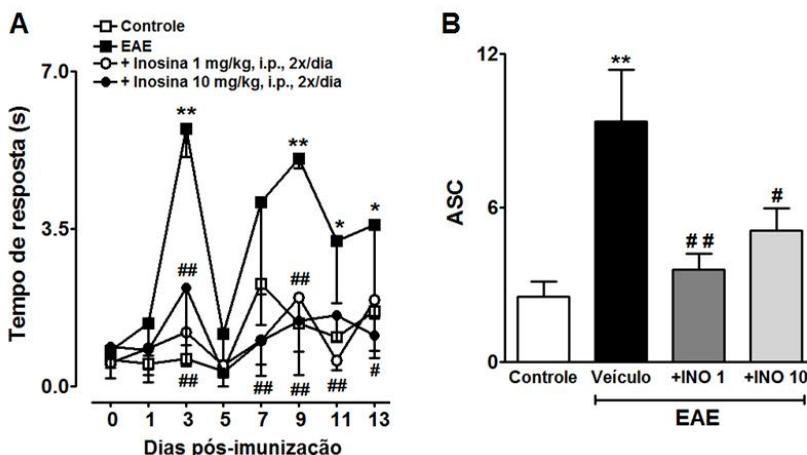


Figura 9: Efeito da inosina sobre a hiperalgesia térmica ao frio induzida pela EAE. Hiperalgesia térmica ao frio avaliada pela acetona (A) e área sob a curva (B) nos grupos controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10 mg/kg (i.p.). Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ representam a diferença estatística do grupo EAE + veículo *versus* o grupo controle, # $p < 0,01$ e ## $p < 0,001$ representam a diferença estatística dos grupos EAE + inosina (1 ou 10 mg/kg) *versus* o grupo EAE + veículo (ANOVA de duas vias – A, ANOVA de uma via – B seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

4.3 EFEITO DA INOSINA SOBRE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E ANSIOSO

Os sintomas relacionados à progressão da EAE, em sua grande totalidade, referem-se às alterações motoras e sensitivas. No entanto, dados recentes demonstram que pacientes portadores dessa doença, geralmente, apresentam sinais de depressão e ansiedade (FEINSTEIN *et al.*, 2014). Alterações anedônicas são observadas pela redução no

consumo de sacarose (TCS) por roedores, podendo ser interpretado como um comportamento típico depressivo (WEISS, 1997). Por esta razão, nesse estudo avaliou-se o efeito tipo-antidepressivo e ansiolítico da inosina durante a fase pré-motora da EAE. Conforme ilustrado na Figura 10, os animais do grupo EAE não apresentaram consumo, significativamente, reduzido de solução de sacarose 1% quando comparado ao grupo controle (Figura 10A). Além disso, o tratamento com inosina na dose de 1 mg/kg não alterou o consumo de solução de sacarose quando comparado ao grupo EAE + veículo (Figura 10A).

Ainda referente ao comportamento tipo-depressivo, avaliou-se o tempo de imobilidade do animal por meio do teste de suspensão pela cauda (TSC). O teste foi realizado no 13º dia p.i. com os grupos controle, EAE + veículo e EAE + inosina 1 mg/kg. Conforme ilustrado na Figura 10B, a indução da EAE não aumentou o tempo de imobilidade nos animais quando comparado ao grupo controle (Figura 10B), enquanto que o tratamento com inosina induziu redução no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle (Figura 10B). Ressalta-se que não houve diferença estatística entre os grupos no tempo de latência para a imobilidade durante o TSC (Figura 10C).

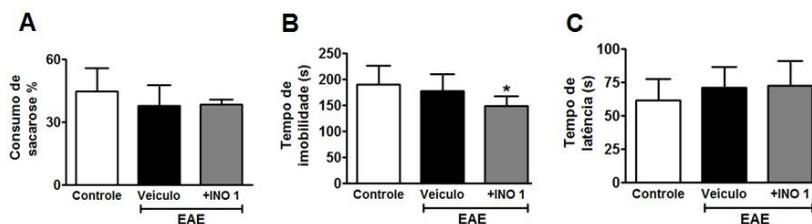


Figura 10: Efeito da inosina sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pela EAE. (A) Consumo de solução de sacarose 1% em relação ao consumo total de líquido (água + solução de sacarose 1%) em %; (B) Tempo de imobilidade dos animais; (C) Tempo de latência para imobilidade. O TCS, assim como o TSC, foram realizados nos animais dos grupos controle, EAE + veículo (i.p.) e EAE + inosina 1 mg/kg (i.p.). Os dados são apresentados como média \pm EPM de 6-11 animais/grupo. * $p < 0,01$ representa a diferença estatística do grupo EAE tratado com inosina 1 mg/kg (i.p.) versus o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

Conforme elucidado previamente, os animais com EAE podem apresentar comportamento tipo-ansioso durante a fase pré-motora da doença (HAJI *et al.*, 2012). Neste contexto, o comportamento tipo-ansioso foi avaliado nos animais dos grupos controle, EAE + veículo e EAE + inosina 1 mg/kg no 12º dia p.i., através do teste LCE. Conforme

ilustrado na Figura 11, não houve diferença significativa quanto ao tempo de permanência no braço fechado entre os grupos (Figura 11A). Além disso, o número de entradas no braço fechado, assim como o número total de entradas nos braços (braço aberto + braço fechado) não distinguiu entre os grupos experimentais (Figuras 11A e 11E), confirmando que não existe diferença locomotora entre os grupos no período analisado (fase pré-motora). No entanto, o tempo de permanência no braço aberto foi menor no grupo EAE + veículo quando comparado ao grupo controle (Figura 11B), enquanto o tratamento com inosina (1 mg/kg) não foi capaz de aumentar o tempo de permanência, assim como o número de entradas no braço aberto quando comparado ao grupo EAE + veículo (Figuras 11B e 11D). Em conjunto, esses dados sugerem que a inosina (1 mg/kg) inibe os sintomas motores e sensitivos induzidos pela EAE, sem afetar de maneira significativa o comportamento tipo-depressivo e ansioso durante a fase pré-motora da EAE.

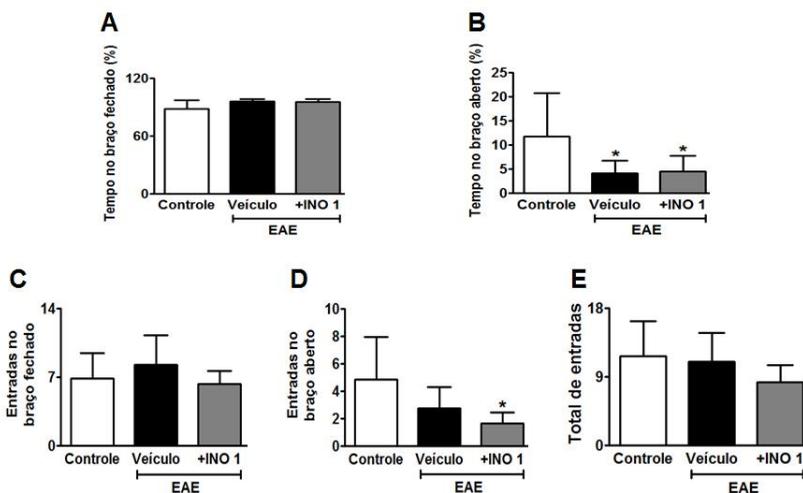


Figura 11: Efeito da inosina sobre o comportamento ansioso induzido pela EAE. O teste do LCE (A-E) foi realizado nos animais dos grupos controle, EAE + veículo (i.p.) e EAE + inosina 1mg/kg (i.p.). (A) Tempo de permanência no braço fechado; (B) Tempo de permanência no braço aberto; (C) Número de entrada no braço fechado; (D) Número de entradas no braço aberto; (E) Total de entradas nos braços - número de entradas no braço aberto + o número de entradas no braço fechado. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 6-11 animais/grupo. * $p < 0,01$ representa a diferença estatística do grupo EAE tratado com veículo ou inosina 1mg/kg (i.p.) versus o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

4.4 EFEITO DA INOSINA SOBRE O TEMPO DE NADO FORÇADO COM SOBRECARGA DURANTE A FASE DE INDUÇÃO DA EAE

A fadiga encontra-se dentre as debilidades comumente associadas à EM que possuem grande influência na QV do paciente (HAUSER SL, 2008). A fim de avaliar esse comportamento no decurso da EAE, realizou-se o teste do nado forçado com sobrecarga no 14º dia p.i. Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram que a indução da EAE foi capaz de induzir redução significativa no tempo de nado quando comparado ao grupo controle (Figura 12), o que demonstra comportamento tipo-fadiga por exaustão. No entanto, o tratamento com inosina (1 mg/kg) não aumentou o tempo de nado, ou seja, não inibiu a exaustão induzida pela EAE durante a fase pré-motora da doença (Figura 12).

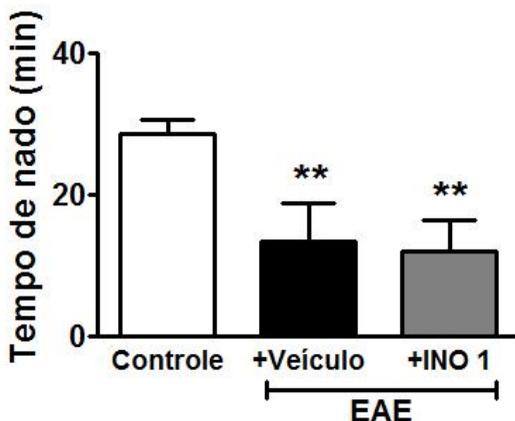


Figura 12: Efeito da inosina sobre o tempo de nado forçado com sobrecarga durante a fase de indução da EAE. Avaliação da fadiga nos animais dos grupos controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1 mg/kg (i.p.). Os dados são apresentados como média ± EPM de 8-11 animais/grupo. ** $p < 0,001$ representa a diferença estatística do grupo EAE + veículo ou inosina 1mg/kg (i.p.) versus o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

4.5 EFEITO DA INOSINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DESMIELINIZANTE INDUZIDA PELA EAE

A migração de células inflamatórias para o SNC no decurso da EAE depende, pelo menos em parte, da ativação das células glias,

principalmente, da microglia, a qual juntamente com os linfócitos T autorreativos contribuem para a neuroinflamação e desmielinização (COMPSTON e COLES, 2008). Portanto, a próxima etapa desse projeto foi avaliar o efeito da inosina na modulação da resposta neuroinflamatória e desmielinizante induzidas pela EAE. Conforme ilustrado na Figura 13, a análise histológica da medula espinhal do grupo controle revelam baixos níveis de células inflamatórias. Entretanto, 40 dias decorridos da imunização, os animais do grupo EAE + veículo apresentaram aumento da infiltração de células inflamatórias na medula espinhal quando comparado ao grupo controle, com destaque para a região da substância branca (Figura 13). De maneira significativa, os animais tratados com inosina (1 e 10 mg/kg) apresentaram redução no infiltrado de células inflamatórias na substância branca da medula espinhal quando comparados ao grupo EAE + veículo (Figuras 13A e 13B).

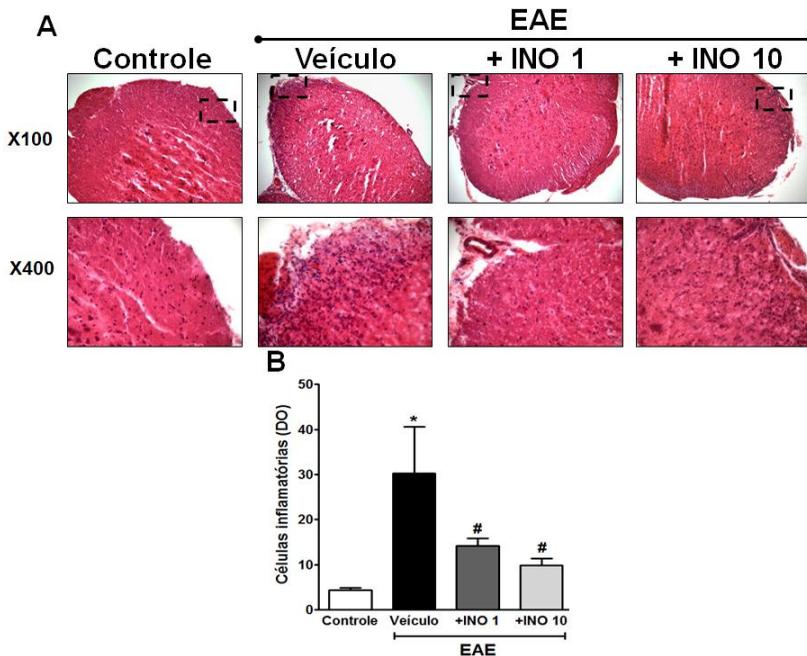


Figura 13: Efeito da inosina sobre o número de células inflamatórias no SNC na fase crônica da EAE. Análise do número de células inflamatórias na medula espinhal (A e B) dos animais controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1 mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10 mg/kg (i.p.). (B) A quantificação foi baseada em uma média de 5-6 campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 4-6 animais/grupo. Aumento de 100 e 400x, respectivamente. Detalhe: foco inflamatório presente na substância branca. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,01$ representa a diferença estatística do grupo EAE + veículo versus o grupo controle, # $p < 0,01$ representa a diferença estatística dos grupos EAE + inosina (1 ou 10 mg/kg) versus o grupo EAE + veículo (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Newmann-Keuls).

Além disso, através da coloração de LFB, após a indução da EAE observou-se intensa área de desmielinização na medula espinhal dos animais EAE + veículo quando comparado ao grupo controle (Figura 14). Em contrapartida, o tratamento com inosina (1 e 10 mg/kg) inibiu, significativamente, a desmielinização na medula espinhal quando comparado ao grupo EAE + veículo (Figura 14). Cabe ressaltar que a

dose de 1 mg/kg manteve o grau de mielinização do tecido próximo ao do grupo controle (Figuras 14A e 14B).

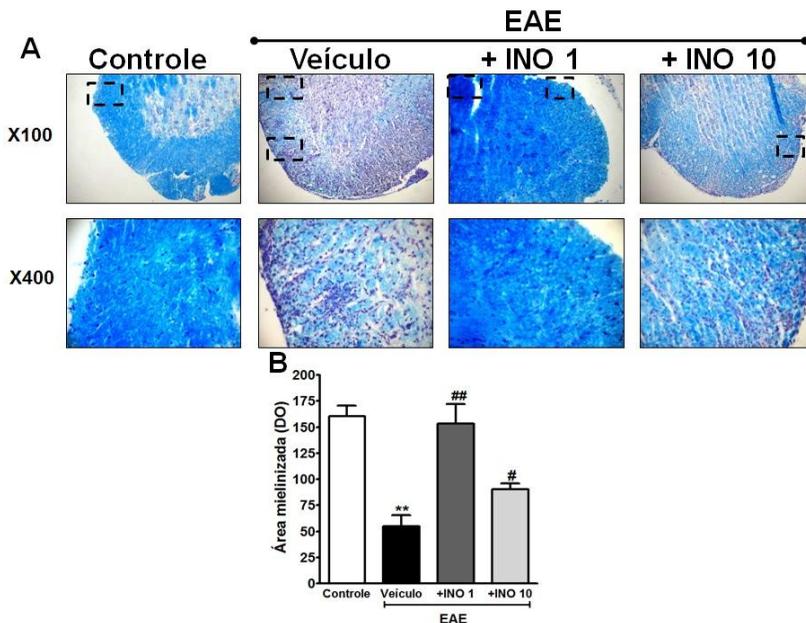


Figura 14: Efeito da inosina na desmielinização induzida pela EAE. Análise da área de desmielinização na medula espinhal (A e B) dos animais controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1 mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10 mg/kg (i.p.). (B) A quantificação foi baseada em uma média de 5-6 campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 4-6 animais/grupo. Aumento de 100 e 400x, respectivamente. Detalhe: área de desmielinização na substância branca. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ** $p < 0,001$ representa diferença estatística do grupo EAE + veículo *versus* o grupo controle, # $p < 0,01$ representa diferença estatística do grupo EAE + inosina (1 mg/kg) *versus* o grupo EAE + veículo (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

4.6 EFEITO DA INOSINA SOBRE A ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA EAE

Além da migração de células T autorreativas para o SNC durante o desenvolvimento da EAE, células gliais, como os astrócitos, são ativadas no decurso da doença contribuindo para sua patogênese (COMABELLA e KHOURY, 2012). Nesse sentido, avaliou-se aqui a ativação de células astrocitárias 40 dias p.i. no SNC. Conforme ilustrado

na Figura 15, as análises histológicas da medula espinhal dos animais controles apresentaram ativação astrocitária basal, a qual foi significativamente aumentada após a indução da EAE (Figuras 15A e 15B). Notavelmente, o tratamento com inosina 1 mg/kg inibiu a ativação astrocitária quando comparado aos animais do grupo EAE + veículo (Figura 15). Por outro lado, o tratamento preventivo com o inosina 10 mg/kg não inibiu, de maneira significativa, a expressão de GFAP na medula espinhal após 40 dias da imunização (Figura 15).

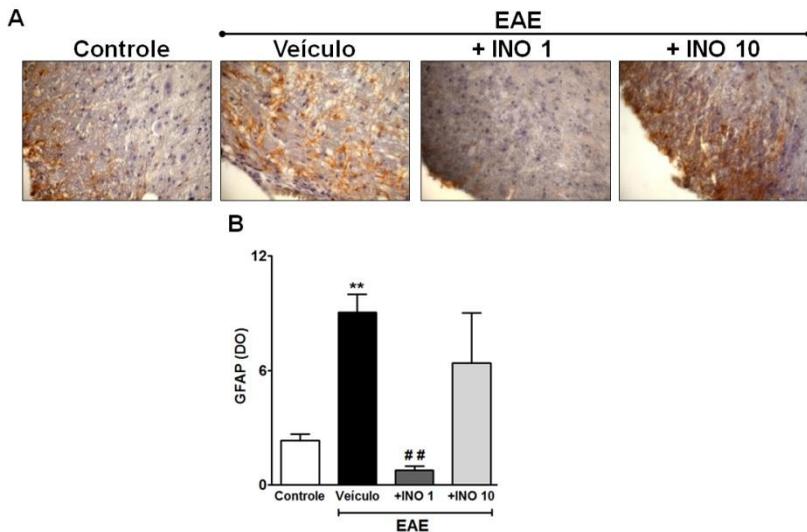


Figura 15: Efeito da inosina sobre a ativação astrocitária durante o desenvolvimento da EAE. Avaliação imunistoquímica da ativação astrocitária na medula espinhal (A e B). A expressão de GFAP foi analisada nos animais controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1 mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10 mg/kg (i.p.). (B) A quantificação foi baseada em uma média de 5-6 campos oculares da substância branca da medula espinhal de um total de 4-6 animais/grupo. Aumento de 400x. DO: densidade óptica. Os dados são apresentados como média ± EPM. ** $p < 0,001$ representa diferença estatística do grupo EAE + veículo *versus* o grupo controle, ## $p < 0,001$ representa a diferença estatística dos grupos EAE + inosina (1 ou 10 mg/kg) *versus* o grupo EAE + veículo (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

4.7 EFEITO DA INOSINA SOBRE O NÍVEL DA CITOCINA IL-17 EM LINFONODOS INGUINAIS APÓS A INDUÇÃO DA EAE

Dentre as citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da EM, estudos prévios demonstram forte associação da IL-17 à

severidade da doença (MATUSEVICIUS *et al.*, 1999; HEDEGAARD *et al.*, 2008). O potencial patogênico da IL-17 na EM está associado a sua acentuada contribuição para com o processo neuroinflamatório (KEBIR *et al.*, 2007). Dados prévios revelam redução da IL-17 em linfócitos de pacientes com EM após o tratamento com agonista para A2AR (VINCENZI *et al.*, 2013). Assim, juntamente com os dados descritos sobre a ação anti-inflamatória da inosina, o próximo objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da inosina sobre o nível de IL-17 em linfonodos inguinais 40 dias após indução da EAE. Os resultados obtidos demonstrados na Figura 16 indicam aumento significativo no conteúdo de IL-17 nos linfonodos do grupo EAE + veículo, quando comparado ao grupo controle. De forma significativa, o tratamento com inosina (1 e 10 mg/kg) inibiu os níveis de IL-17 após indução da EAE (Figura 16). Em conjunto, os nossos dados sugerem que o tratamento com inosina bloqueia o desenvolvimento da doença, assim como a neuroinflamação e desmielinização, por diminuir a expansão/ativação e/ou proliferação de linfócitos pró-encefalitogênicos, especialmente Th17, principal produtor de IL-17, nos órgãos linfóides periféricos.

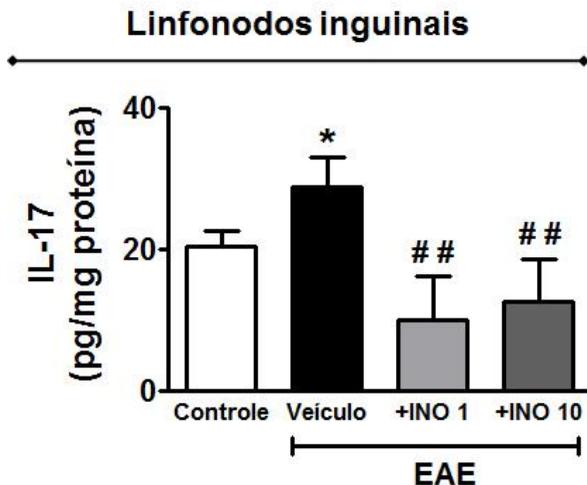


Figura 16: Efeito da inosina nos níveis de IL-17 em linfonodos inguinais após a indução da EAE. Quantificação dos níveis de IL-17 por ELISA nos linfonodos inguinais dos animais controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1 mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10 mg/kg (i.p.) no 40º dia após a imunização. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. * $p < 0,01$ representa diferença estatística do grupo EAE + veículo *versus* o grupo controle, ## $p < 0,001$ representa a diferença estatística dos grupos EAE + inosina (1 ou 10 mg/kg) *versus* o grupo EAE + veículo (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

4.8 EFEITO DA INOSINA NA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES A1 E A2A NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS APÓS INDUÇÃO DA EAE

De acordo com estudos anteriores, pacientes com EM possuem alterações na expressão de receptores adenosinérgicos, tal como redução nos níveis de A1R (JOHNSTON *et al.*, 2001). Autores relatam que a expressão e a ativação do receptor A1 *in vivo* são importantes para a redução da severidade da EAE, o qual envolve inibição do processo de desmielinização e da ativação microglial (HASELKORN *et al.*, 2010; TSUTSUI *et al.*, 2004; 2008). Além disso, conforme descrito previamente, o A2AR está envolvido no controle da inflamação (GARCIA *et al.*, 2008; VINCENZI *et al.*, 2013) e, paralelamente, sua expressão encontra-se aumentada no SNC de pacientes com EM (RISSANEN *et al.*, 2013). Ademais, dados prévios sugerem que a inosina pode modular, pelo menos em parte, seus efeitos fisiológicos

através da interação com os receptores adenosinérgicos, principalmente A1 e A2A, expressos tanto na periferia como no SNC (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004). Assim, o próximo objetivo do presente estudo foi avaliar se o efeito antinociceptivo e imunomodulador da inosina estaria relacionado com os receptores adenosinérgicos expressos no SNC. Para isso, os níveis de expressão de A1R e A2AR foram avaliados na medula espinal dos animais 40 dias após a imunização. Como esperado, a indução da EAE resultou em aumento significativo na expressão do A2AR na medula espinal (Figuras 17A e 17C), em contrapartida, a indução da EAE resultou em reduzida expressão de A1R, como demonstrado nas Figuras 17A e B. De modo interessante, o tratamento preventivo com inosina (1 e 10 mg/kg) reduziu significativamente a expressão de A2A induzida pela EAE (Figuras 17A e 17C), sem afetar os níveis do A1R (Figuras 17A e 17B). Em conjunto estes dados sugerem que modulação nos níveis de expressão de A2AR no SNC pela inosina seja, em parte, responsável pela inibição da progressão da EAE. Esse efeito pode decorrer, principalmente, da redução do infiltrado inflamatório no SNC pela inosina, por exemplo, de linfócitos T, nos quais o A2AR é abundantemente expresso, além dos níveis reduzidos de IL-17 nos tecidos linfoides periféricos, que em conjunto induzem a neuroinflamação e conseqüente desmielinização.

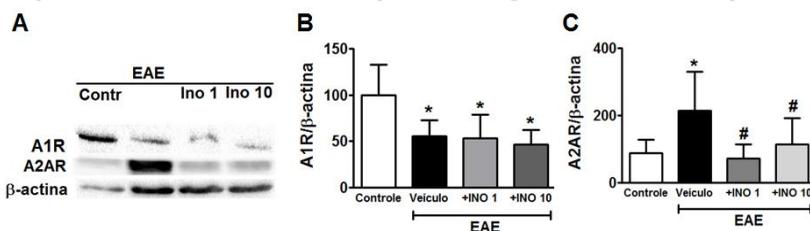


Figura 17: Efeito da inosina na expressão dos receptores A1 e A2A na medula espinal dos animais após a indução da EAE. Imunodeteção do A1R e A2AR por *Western blotting* e o efeito da inosina sobre a expressão dos receptores adenosinérgicos (A-C) na medula espinal dos animais dos grupos controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1 mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10 mg/kg (i.p.). (A) Imagem representativa do ensaio de *Western blotting* do A1R, A2AR e da β-actina; (B) Quantificação da expressão do A1R normalizado pela β-actina. (C) Quantificação da expressão do A2AR normalizado pela β-actina. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,01$ representa a diferença estatística do grupo EAE + veículo *versus* o grupo controle, # $p < 0,01$ representa a diferença estatística dos grupos EAE + inosina (1 ou 10 mg/kg) *versus* o grupo EAE + veículo (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

4.9 EFEITO DA INOSINA NA EXPRESSÃO E FOSFORILAÇÃO DA ENZIMA ERK1 NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS APÓS A INDUÇÃO DA EAE

No SNC, o A2AR interage com o sistema proteína Gs/AC/AMPC/RAP-1A, o qual resulta na ativação da proteína cinase ativada por mitógenos 1-3 (ERK1/2), independente da proteína cinase A (PKA) (WYATT *et al.*, 2002). Além disso, dados anteriores demonstraram que o aumento de fosforilação da ERK1 contribui para a patofisiologia da EAE (SHIN *et al.*, 2003; BRERETON *et al.*, 2009). Assim, a fim de compreender o mecanismo pelo qual a inosina modula o desenvolvimento da EAE, a próxima etapa desse estudo foi avaliar a expressão da proteína ERK1 no SNC após a indução da doença. Conforme ilustrado na Figura 18, a fosforilação da proteína ERK1 aumentou de maneira significativa nos animais do grupo EAE + veículo quando comparado ao grupo controle (Figuras 18A e 18B). No entanto, o tratamento com inosina (1 e 10 mg/kg) não foi capaz de reduzir a fosforilação da proteína ERK1 no SNC quando comparado ao grupo EAE + veículo (Figuras 18A e 18B). Ressalta-se que não houve diferença significativa na expressão da forma não fosforilada da proteína ERK1 (Figuras 18A e 18C). Assim, em conjunto, esses dados sugerem que os efeitos imunomodulador e analgésico da inosina durante o desenvolvimento da EAE dependem, em parte, da modulação do receptor A2A por vias independentes da proteína cinase ERK1.

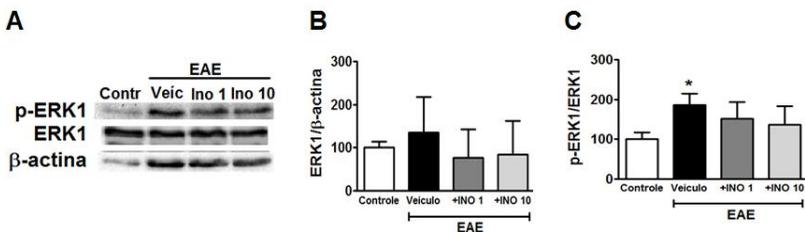


Figura 18: Efeito da inosina na expressão da enzima ERK1 na medula espinal dos animais após a indução da EAE. Imunodeteção da enzima ERK1 por *Western blotting* e o efeito da inosina sobre a expressão da proteína ativada por mitógeno (A-C) na medula espinal dos animais pertencentes aos grupos controle, EAE + veículo (i.p.), EAE + inosina 1 mg/kg (i.p.) e EAE + inosina 10 mg/kg (i.p.). (A) Imagem representativa do ensaio de *Western blotting* de ERK1, p-ERK1 e da β-actina; (B) Quantificação de p-ERK1 normalizada pela ERK1; (C) Quantificação da expressão de ERK1 normalizada pela β-actina. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,01$ representa diferença estatística do grupo EAE + veículo *versus* o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de *Newmann-Keuls*).

5. DISCUSSÃO

Uma doença inflamatória crônica desmielinizante, acompanhada por inúmeras debilidades permanentes, tal como a EM (MCFARLAND e MARTIN, 2007; NYLANDER e HAFLER, 2012), requer uma terapia prolongada e, portanto, ausente de efeitos adversos que possam surgir ao longo do tratamento. As terapias de primeira escolha para o tratamento da EM tem trazido benefícios, porém, com um número reduzido de pacientes responsivo (GAJOFATTO *et al.*, 2009), além de baixa eficácia na prevenção do acúmulo de déficits, assim como na evolução da doença (MORRISSEY, LE PAGE e EDAN, 2005; SCHREMPF e ZIEMSEN, 2007; BERMEL *et al.*, 2013). Devido a essas limitações terapêuticas, tratamentos complementares tornam-se necessários (RUBIN, 2013b). Desse modo, dentre os desafios atuais na busca de novos agentes terapêuticos para o tratamento da EM, encontra-se a eliminação de efeitos adversos potenciais, medicamentos de baixo custo, além de terapias mais eficazes para a EM do tipo progressiva e ausente de surtos (CARRITHERS, 2014).

Embora haja um desprovimento de dados acerca dos possíveis efeitos protetores da inosina na EM, estudos relacionados a demais patologias têm demonstrado efeitos anti-hiperalgésicos (NASCIMENTO *et al.*, 2010; 2014), neuroprotetores (ZAI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2013; KURICOVA *et al.*, 2014) e anti-inflamatórios (HASKO *et al.*, 2000; MARTON *et al.*, 2001; DA ROCHA LAPA *et al.*, 2013), além de ações sobre modelos de doenças autoimunes (MABLEY *et al.*, 2003; 2003a) e neurodegenerativas (CIPRIANI, BAKSHI e SCHWARZSCHILD, 2014). Assim, a principal motivação desse trabalho foi investigar o efeito imunomodulador da inosina no modelo animal de EM.

Os resultados obtidos revelaram a ação potencial da inosina (1 e 10 mg/kg) em retardar o aparecimento dos sinais clínicos da EAE, assim como sua severidade, quando presentes, indicando efeito inibitório do desenvolvimento e progressão da doença. Além dos escores clínicos, a inosina inibiu a perda de peso induzida pela EAE, com destaque para a dose de 1 mg/kg, de forma semelhante ao grupo controle. Esses resultados suportam trabalhos prévios realizados com pacientes portadores de EM, no qual efeitos semelhantes na redução de sinais clínicos, assim como na manutenção da melhora clínica, foram obtidos pelo tratamento oral com inosina (TONCEV, 2006; MARKOWITZ *et al.*, 2009).

Conforme descrito anteriormente, a patofisiologia da EM, assim como do modelo de EAE, envolve a migração de células inflamatórias

autorreativas e, uma vez no SNC, essas células são reativadas desencadeando a neuroinflamação. (HAFLER, 2004; COMABELLA e KHOURY, 2012). Como esperado, o grupo EAE + veículo demonstrou proeminente neuroinflamação em relação ao grupo controle, observada pela técnica histológica de H&E, estando de acordo com os trabalhos prévios do mesmo grupo de pesquisa (DUTRA *et al.*, 2011). Ao passo que se instala a neuroinflamação, decorrente da liberação de mediadores inflamatórios, é estabelecido um processo neurodegenerativo no SNC, tendo como alvos principais os oligodendrócitos e a bainha de mielina (COMABELLA e KHOURY, 2012), as quais foram reafirmadas neste trabalho pela presença de áreas de desmielinização na medula espinhal decorrentes da EAE, conforme demonstrado previamente (DUTRA *et al.*, 2011). Assim, pela primeira vez na literatura, o presente trabalho demonstra o efeito protetor da inosina na neuroinflamação induzida pela EAE, além da sua eficácia em prevenir o alto grau de desmielinização provocado pela doença, com destaque para a dose de inosina 1 mg/kg. Por fim, em conjunto, esses dados sugerem que o efeito protetor da inosina sobre a neuroinflamação é reforçado pelo controle do processo desmielinizante, tendo visto que esse sucede o processo neuroinflamatório.

De acordo com a literatura, o efeito imunomodulador e neuroprotetor da inosina envolve a participação de receptores adenosinérgicos, principalmente, os subtipos A1 e A2A (HASKO *et al.*, 2000; MARTON *et al.*, 2001). Posteriormente, estudos com pacientes portadores de EM, assim como em modelos animais, demonstraram o envolvimento desses mesmos receptores na modulação da doença. (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004; RISSANEN *et al.*, 2013). Nesse sentido, buscou-se investigar a expressão desses receptores, assim como sua correlação com os efeitos da inosina sobre a neuroinflamação, desmielinização e consequente déficit motor induzido pela EAE.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a EAE reduziu a expressão de A1R e, por outro lado, exacerbou a expressão de A2AR na medula espinhal de animais EAE + veículo 40 dias p.i., quando comparados ao grupo controle. Esses dados estão em conformidade aos encontrados na literatura, os quais demonstraram o aumento na expressão de A2AR em cérebro de pacientes com EMPS, após análises de IRM, associada a escores exacerbados e ao alto grau de neurodegeneração (RISSANEN *et al.*, 2013). De forma similar, baixos níveis de A1R foram encontrados no SNC de pacientes com EM, de acordo com estudos anteriores (JOHNSTON *et al.*, 2001; TSUTSUI *et al.*, 2008). Segundo Mills e colaboradores (2012), a expressão de A2AR

no SNC faz-se necessária para que ocorra a progressão da EAE, através do aumento da infiltração de células inflamatórias. De forma semelhante, Tsutsui e autores (2004) demonstraram que a expressão do A1R também é relevante na EAE, pois sua expressão reduz a severidade e a progressão da doença, enquanto sua ausência culmina com ativação microglial e desmielinização acentuadas. Dessa forma, sugere-se que o desenvolvimento e a progressão da doença nos animais do grupo EAE + veículo, juntamente à elevada neuroinflamação e consequente desmielinização, deve-se, em parte, às alterações encontradas na expressão dos receptores A1 e A2A no SNC.

Os resultados obtidos pelo tratamento preventivo com inosina (1 e 10 mg/kg) demonstram efeito modulador na redução do nível de expressão de A2AR na medula espinhal de animais com EAE estabelecida, sem afetar a expressão do A1R. Nesse contexto, Tsutsui e colaboradores (2008) sugerem que a expressão de A1R na EM, assim como na EAE, seja influenciada pela proteína β -arrestina-1, a qual se encontra aumentada no SNC devido ao processo inflamatório da doença e, conseqüentemente, suprime a expressão de A1R. Além disso, estudos anteriores relatam o envolvimento de arrestinas como antígenos nas doenças autoimunes do SNC, dentre elas a EM (OHGURO *et al.*, 1993; FOROOGHIAN *et al.*, 2007). Assim, uma possível explicação para o não reestabelecimento dos níveis de A1R pela inosina durante o desenvolvimento da EAE, seja que sua ação não envolva a redução da expressão de β -arrestina-1 no SNC. De acordo com estudos prévios, a ativação de A1R contribui para a redução da severidade da EAE, além de reduzir o processo desmielinizante e a ativação microglial (HASELKORN *et al.*, 2010; ASGHARI *et al.*, 2013). Por esta razão, apesar da ativação de A1R pela inosina ocorra em níveis reduzidos no SNC, nossos dados sugerem que para a redução efetiva do desenvolvimento e progressão da EAE via A1R, após o tratamento com inosina, seja necessário o aumento prévio na expressão central desse receptor.

Mills e colaboradores (2012) indicam que a redução de A2AR no SNC coincide com a inibição da progressão da EAE, através da prevenção na infiltração de células inflamatórias para dentro do SNC. Ademais, dados de Paternit e colaboradores (2011) indicam que o efeito neuroprotetor de agonistas A2AR, administrados sistemicamente em modelo de dano à medula espinhal, se deve a uma ação periférica, uma vez que não ocorre neuroproteção quando o agonista é administrado centralmente. Por outro lado, os dados aqui apresentados sugerem que o efeito neuroprotetor da inosina deva-se à redução da expressão do

A2AR no SNC. Outros estudos indicam as células imunológicas como principal alvo de agonistas A2AR, os quais melhoram o déficit locomotor (LI *et al.*, 2006) e inibem da resposta inflamatória (LAPPAS, RIEGER e LINDEN, 2005; KRECKLER *et al.*, 2006; ALAM *et al.*, 2009). Reforçando essa hipótese, estudo prévio em pacientes com EM demonstrou elevada expressão de A2AR em linfócitos, cuja ativação provocou inibição de mediadores pró-inflamatórios, assim como de moléculas de adesão à BHE e do fator de transcrição - NF- κ B (VINCENZI *et al.*, 2013).

Além disso, estudos anteriores demonstraram a associação da IL-17 à severidade da doença e às placas de desmielinização em pacientes com EM (MATUSEVICIUS *et al.*, 1999; HEDEGAARD *et al.*, 2008). Verificou-se ainda que a IL-17 regula diferentes vias de sinalização pró-inflamatórias (SHABGAH, FATTAHI e SHAHNEH, 2014), além de contribuir para a ruptura da BHE e, assim, facilitar a neuroinflamação com consequente dano ao SNC (KEBIR *et al.*, 2007). Pesquisas anteriores no modelo de EAE têm demonstrado níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-17, em órgãos linfoides periféricos tais como os linfonodos (DUTRA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2003). Visto o importante papel da citocina IL-17 na patogênese da EM e na EAE, investigou-se a modulação da inosina sobre sua produção em linfonodos após estabelecida a EAE. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram aumento significativo na quantidade de IL-17 no grupo EAE + veículo, quando comparado ao grupo controle. De forma acentuada, o tratamento com inosina (1 e 10 mg/kg) foi capaz de reduzir os níveis de IL-17 decorrentes da EAE. Esses dados corroboram com os dados publicados por Vicenzi e colaboradores (2013), os quais demonstraram elevada produção de IL-17 em linfócitos de pacientes com EM, os quais foram reduzidos pela ação de agonista A2AR. Por esta razão, e com base nos estudos prévios demonstrando que a supressão de IL-17 no modelo de EAE contribui para a inibição do desenvolvimento e redução na severidade da doença (KOMIYAMA *et al.*, 2006), pode-se sugerir que o efeito neuroprotetor da inosina na EAE advém, em parte, da redução periférica nos níveis de IL-17.

Diferentes células do sistema imunológico podem secretar IL-17, tais como neutrófilos, células dendríticas, células T natural killer, células $T\gamma\delta$ e, principalmente, células Th17 (YAMADA, 2010). Conforme anteriormente, as células Th17 possuem importante papel na patogênese da EM e EAE (MONTES *et al.*, 2009; DUTRA *et al.*, 2011). Considerando o efeito inibitório da inosina sobre o nível de IL-17 em linfonodos, sugere-se, ainda, que ela possa atuar sobre as células Th17,

seja na sua diferenciação e/ou proliferação. Em conjunto, os dados obtidos sugerem que o efeito imunomodulador da inosina no modelo experimental de EM ocorra, em parte, pela inibição da resposta inflamatória induzida pelos linfócitos Th17 autorreativos via ativação de receptores A2A. Entretanto, faz-se necessário estudo adicional para os esclarecimentos dessa possível ação e confirmação da hipótese supracitada.

Além das células inflamatórias, há evidências de que a ativação astrocitária contribua para a progressão da EM, assim como da EAE (PITT, WERNER e RAINE, 2000; DUTRA *et al.*, 2011). A presença dessas células gliais na região perivascular pode influenciar na permeabilidade da BHE (ENGELHARDT, 2010), além de produzirem citocinas, como TNF- α e IL-17, as quais contribuem para o recrutamento de células inflamatórias para o SNC (KIPP *et al.*, 2008; TZARTOS *et al.*, 2008; MCFARLAND e MARTIN, 2007). Além disso, a neuroinflamação pode exacerbar-se com a interação entre a microglia ativada e os astrócitos (BAL-PRICE e BROWN, 2001), além de potencializarem a perda de oligodendrócitos e a desmielinização (NYLANDER e HAFLE, 2012). Estudos *in vitro* demonstram a presença de receptores adenosinérgicos expressos nos astrócitos (MATUTE e CAVALIERE, 2011) e correlacionam a ativação de A1R e A3R à redução na expressão de genes relacionados à inflamação (GESSI *et al.*, 2013).

Conforme as evidências apresentadas que correlacionam os astrócitos à patogênese da EAE, investigou-se o efeito da inosina sobre a ativação astrocitária após o desenvolvimento da doença. De fato, verificou-se exacerbada ativação astrocitária decorrente da EAE, através da expressão de GFAP, cujo tratamento com inosina na dose de 1 mg/kg foi capaz de inibir significativamente. Entretanto, observou-se que a dose de 10 mg/kg de inosina não foi eficaz em inibir a atividade astrocitária. Estudos prévios têm demonstrado que a ativação astrocitária por IL-17 promove quimiotaxia de células inflamatórias, além de poder contribuir com a ruptura da BHE e consequente neuroinflamação (CARLSON *et al.*, 2008). Assim, verificou-se que a inosina (1 e 10 mg/kg) foi capaz de reduzir a produção de IL-17 em linfócitos, além de inibir o processo neuroinflamatório. Desse modo, sugere-se que a inibição da atividade astrocitária pela inosina na dose de 1 mg/kg seja, em parte, via redução de IL-17 nos órgãos linfoides periféricos e suas consequentes ações patogênicas. Ademais, pode-se sugerir que a inibição da atividade astrocitária pela inosina contribua também para a redução da resposta neuroinflamatória e consequente desmielinização.

Por outro lado, considerando que o bloqueio de A2AR em astrócitos reduz a excitotoxicidade por glutamato (PINTOR *et al.*, 2004), sugere-se que a dose de 10 mg/kg ative maior número de A2AR nessas células, a ponto de exacerbar sua atividade. Sabido que a EM é caracterizada por excitotoxicidade glutamatérgica, (MATUTE e CAVALIERE, 2011), a qual pode ser decorrente da ativação astrocitária (PITT, WERNER e RAINE, 2000), estudos adicionais podem esclarecer se o efeito da inosina no controle da progressão da EAE envolve a supressão da liberação de glutamato pelos astrócitos.

Ao longo dos anos, o conhecimento adquirido sobre as cinases e seus inibidores tem incitado a busca por novas terapias para as doenças neurodegenerativas (CUNY, 2009). Tan e colaboradores (1999) demonstraram que a inibição de ERK1/2 está correlacionada à reduzida liberação de TNF- α pela microglia. Em contrapartida, autores sugerem que o aumento na fosforilação de ERK contribui para a maturação de oligodendrócitos *in vitro* e, conseqüentemente, com o processo remielinizante (FYFFE-MARICICH *et al.*, 2013). Como previamente descrito nesse trabalho, o envolvimento da expressão gênica de ERK1/2 na patogênese da EAE é contraditória, uma vez que a deleção gênica de ERK1 exacerba a progressão e a severidade da EAE (AGRAWAL *et al.*, 2006), enquanto inibidores da cinase ERK1/2 são capazes de bloquear a severidade clínica da doença (BRERETON *et al.*, 2009). Além disso, demonstrou-se que ativação de A2AR desencadeia vias de sinalização que inibem ERK1/2 em células T, com conseqüente redução do processo inflamatório (HUANG *et al.*, 1997; LAPPAS, RIEGER e LINDEN, 2005).

Nesse contexto, investigou-se a expressão e a fosforilação de ERK1 na medula espinhal, assim como o efeito da inosina sobre essa cinase após estabelecida a EAE. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a expressão de ERK1 não foi alterada, de forma significativa, entre os grupos, ao passo que a forma fosforilada da enzima no grupo EAE + veículo aumentou significativamente em relação ao grupo controle. Ademais, o tratamento com inosina (1 e 10 mg/Kg) reduziu a fosforilação de ERK1, embora não significativamente.

Estudos anteriores sugerem que o aumento de p-ERK1 decorrente da EAE ocorre devido ao elevado processo neuroinflamatório, com conseqüente aumento da severidade da EAE (BRERETON *et al.*, 2009). Por esta razão, o efeito obtido pela inosina indicam duas hipóteses: a baixa inibição de p-ERK1 inferiu, parcialmente, na redução da resposta neuroinflamatória e, por outro lado, compensou a neurodegeneração via fosforilação de ERK1 em oligodendrócitos. No entanto, sabe-se que a

ativação do A2AR pode envolver a ativação de PKA/CREB ou PI3K/NF- κ B, independente de ERK1/2 (WYATT *et al.*, 2002). Em conjunto, esses dados sugerem que o efeito imunomodulador da inosina durante o desenvolvimento da EAE parece depender, pelo menos em parte, da modulação do receptor A2A de maneira independente da proteína ERK1. Assim, estudos posteriores são necessários para esclarecer qual(is) via(s) de sinalização é(são) ativada(s) pela inosina durante a resposta neuroinflamatória autoimune, assim como em qual(is) tipo(s) celular(es) esses efeitos estão ocorrendo.

A dor neuropática é considerada um dos sintomas mais pronunciados na EM, a qual geralmente antecede o aparecimento dos sintomas motores ou surge imediatamente após o seu início (OSTERBERG, BOIVIE e THUOMAS, 2005; OSTERBERG e BOIVIE, 2010; SVENDSEN *et al.*, 2005). De forma semelhante, estudos anteriores demonstraram no modelo de EAE o desenvolvimento da dor neuropática durante a fase pré-motora da doença (SCHMITZ *et al.*, 2014; WARWICK *et al.*, 2014; DUTRA *et al.*, 2013a). Assim, como esperado, a dor neuropática mecânica e térmica ao frio, foi observada no período pré-motor da EAE. O aumento da resposta algésica mecânica decorrente da EAE foi observada pela aplicação de filamentos de von Frey de 0,4 e 0,6g, uma vez que ambas as forças, geralmente, incitam hiperalgesia mecânica moderada nos animais controle (LU *et al.*, 2012). Porém, não se observou diferenças significativas entre as respostas com os diferentes filamentos.

Estudos anteriores demonstram a ação inibitória da dor neuropática pela adenosina, tanto em humanos (BELFRAGE *et al.*, 1995) como em modelos animais (SAWYNOK, 1998). Além disso, estudo prévio demonstrou ação anti-hiperalgésica, mecânica e térmica, *in vivo* da inosina na dor neuropática e inflamatória. (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Conforme previsto, observou-se que, na dor neuropática decorrente da EAE, a hiperalgesia térmica ao frio foi significativamente reduzida pela inosina (1 e 10 mg/kg), além da inibição da hiperalgesia mecânica obtida, apenas, pela dose de 1 mg/kg. Ademais, a atividade antinociceptiva da inosina foi correlacionada à ativação de receptores adenosinérgicos, tanto A1 como A2A (NASCIMENTO *et al.*, 2010; 2014). Além disso, estudo recente demonstrou que a administração intratecal do agonista para o receptor A2A inibiu a dor neuropática através da modulação da via de sinalização PKA/PKC (LORAM *et al.*, 2013) Estudos *in vivo* demonstraram que, além da neuroinflamação, o aumento da atividade astrocitária está relacionado ao controle da dor neuropática decorrente da EAE, (OLECHOWSKI, TRUONG e KERR,

2009; DUTRA *et al.*, 2013a). Outros estudos *in vivo* demonstraram que, além de contribuir com o processo inflamatório, a IL-17 tem participação relevante no desenvolvimento da dor neuropática (KIM e MOALEM-TAYLOR, 2011; DAY *et al.*, 2014) Neste sentido, sugere-se que o efeito anti-hiperalgésico da inosina na EAE esteja relacionado ao seu efeito inibitório na atividade astrocitária, possivelmente, através da modulação dos receptores de A2A, como também ao efeito redutor do nível periférico de IL-17. No entanto, a interação da inosina com o A1R durante o desenvolvimento da EAE precisa ser futuramente investigada. Ainda nesse contexto, um interessante estudo publicado no ano de 2009 demonstrou que o receptor A1 modula, principalmente, a hiperalgesia térmica (mediada por fibras C), sem afetar efetivamente a hiperalgesia mecânica (mediada por fibras A δ) (CAIRNS, 2009). Assim, em conjunto, esses dados sugerem que o efeito anti-hiperalgésico térmico, mas não mecânico, da inosina na dose de 10 mg/kg possa estar relacionado a ativação de A1R em fibras C e não A δ , a qual induziu um desequilíbrio nas vias de sinalização da dor.

Além dos déficits motores e sensoriais induzidos pela EAE, estudos recentes demonstraram o surgimento de déficits cognitivos e emocionais, durante a fase pré-motora da doença, dos quais se destacam a perda de memória, depressão e ansiedade (PAPARRIGOPOULOS *et al.*, 2010; STOJANOVICH, 2010; DUTRA *et al.*, 2013b). A depressão é caracterizada como indisposição persistente associada à perda de prazer por atividades diárias. Esse distúrbio tem sido diagnosticado em aproximadamente 25-50% dos pacientes com EM (SADOVNICK *et al.*, 1996; CHWASTIAK *et al.*, 2002), elevando-se à medida que a doença progride (FEINSTEIN *et al.*, 1992; VUGER-KOVACIC *et al.*, 2007). Assim como a dor, esses sintomas surgem previamente aos déficits locomotores (ACHARJEE *et al.*, 2013; PIRAS *et al.*, 2013). De forma inesperada, os resultados obtidos neste trabalho não confirmaram a presença do comportamento tipo-depressivo durante a fase pré-motora da EAE. Entretanto, observou-se a ação tipo-antidepressiva da inosina no teste de suspensão pela cauda (TSC) com redução significativa do tempo de imobilidade dos animais. Dentro desse contexto, estudos conduzidos por Kaster e colaboradores (2004; 2013) demonstraram que tanto a adenosina, como a inosina, possuem efeito tipo-antidepressivo *in vivo* avaliado pelo TSC, através da interação com os receptores purinérgicos A1 e A2A. Além disso, Muto e colaboradores (2014) observaram o efeito tipo-antidepressivo da inosina através da inibição da anedonia. Entretanto, com os resultados obtidos nesse estudo não podemos sugerir uma ação tipo-antidepressiva da inosina sobre o

modelo de EM, considerando que não foi possível observar o comportamento tipo-depressivo durante o desenvolvimento da EAE.

Apesar dos sintomas de ansiedade receber menor atenção quando comparados aos sintomas de depressão, esses também contribuem para a morbidade na EM (KOROSTIL e FEINSTEIN, 2007; PODER *et al.*, 2009). As manifestações de ansiedade podem surgir concomitantemente aos sinais típicos de EM (Ó DONNCHADHA *et al.*, 2013), os quais podem exacerbar as disfunções cognitivas dos pacientes (GORETTI *et al.*, 2014) ou, ainda, podem independer das manifestações da EM (PIRAS *et al.*, 2013). Estudos anteriores demonstram que comportamentos tipo-ansioso podem ser verificados concomitantemente, ou não, aos déficits motores induzidos pela EAE (ACHARJEE *et al.*, 2013; PERUGA *et al.*, 2011). Em contrapartida, outro trabalho demonstrou que os sinais tipo-ansiedade estão ausentes no modelo experimental de EM (RODRIGUES *et al.*, 2011). Os resultados aqui apresentados demonstram o comportamento tipo-ansioso nos animais com EAE, durante a fase pré-motora da doença. A manifestação ocorreu pelo tempo significativamente reduzido de permanência dos animais no braço aberto do labirinto em cruz elevado.

O envolvimento dos receptores adenosinérgicos na modulação da ansiedade em humanos é controverso (GREEN e SULS, 1996; HASKELL *et al.*, 2005). Entretanto, em modelos animais, a ativação de receptores adenosinérgicos induziu ação ansiolítica (JAIN *et al.*, 1995; KULKARNI, SINGH e BISHNOI, 2007). Embora o recente estudo de Muto e colaboradores (2014) tenha demonstrado o efeito ansiolítico da inosina, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a inosina (1 mg/kg) não foi capaz de prevenir a comportamento tipo-ansiedade induzida pela EAE. Trabalhos recentes têm sugerido que o comportamento tipo-ansioso correlaciona-se aos níveis elevados de TNF- α durante a fase neuroinflamatória pré-motora. (HAJI *et al.*, 2012; ACHARJEE *et al.*, 2013). Além disso, outros trabalhos demonstraram a eficácia da inosina em reduzir os níveis de TNF- α em modelos de doenças isquêmicas e inflamatórias, através da interação com os receptores adenosinérgicos (HASKO *et al.*, 2000; DA ROCHA LAPA *et al.*, 2012). Por esta razão, análises complementares são necessárias, a fim de investigar o efeito da inosina nos níveis de TNF- α durante a progressão da EAE e sua correlação com comportamento tipo-ansiedade. Ainda, cabe questionar se a data da análise foi a melhor determinada, assim como ocorrido nos testes para avaliação de comportamento tipo-depressão. Embora os testes tenham sido realizados na fase pré-motora, como consta na literatura, talvez seja possível

identificar esses comportamentos em momentos distintos nessa fase da doença.

A fadiga evidenciada nos pacientes com EM pode ser definida como: a falta de energia mental e física para a realização de atividades diárias, podendo surgir a qualquer momento, independente da necessidade de realização de menor ou maior esforço (RUBIN, 2013a). Tanto o aparecimento quanto o grau de fadiga na EM são influenciados pelos próprios sintomas da doença (KROENCKE, LYNCH e DENNEY, 2000), tais como depressão, insônia e pelas terapias imunomoduladoras (RUBIN, 2013a). Assim, utilizando o modelo experimental do nado forçado com sobrecarga (WLST), teste comumente aplicado para verificar propriedades anti-fadiga de compostos naturais (JIN e WEI, 2011; QI *et al.*, 2014), foi possível verificar o comportamento tipo-fadiga nos animais com EAE, já nos primeiros dias após a imunização. O resultado obtido é suportado pelo trabalho de Flachenecker e colaboradores (2004), o qual demonstrou a presença de fadiga nos pacientes portadores de EM.

Nesse contexto, estudos anteriores sugerem que a adenosina é capaz de atenuar a fadiga muscular esquelética *in vitro* através da ativação de receptores A1 (READING e BARCLAY, 2001). Ademais, a inosina foi capaz de reduzir níveis de TNF- α *in vivo* (HASKO *et al.*, 2000; DA ROCHA LAPA *et al.*, 2012), um importante mediador pró-inflamatório associado à fadiga na EM (FLACHENECKER *et al.*, 2004). No entanto, o tratamento preventivo com inosina (1 mg/kg) não foi capaz de inibir os sinais tipo-fadiga associados à EAE, apesar dos efeitos positivos no escore clínico, perda de peso e dor neuropática. Assim, análises complementares dos níveis de TNF- α após o tratamento com inosina podem auxiliar no esclarecimento do seu efeito sobre os sinais tipo-fatiga. Além disso, os estudos relacionados ao efeito da inosina como suplemento alimentar têm falhado em demonstrar sua colaboração para o aumento da *performance* física de atletas (STARLING *et al.*, 1996a; MCNAUGHTON, DALTON e TARR, 1999). Desse modo, testes que avaliem comportamento tipo-fadiga por falta de interesse em realizar atividades físicas e não por exaustão, como o WLST utilizado, podem ser mais eficazes em demonstrar o efeito inibitório da inosina.

6 CONCLUSÃO

O conjunto de dados apresentados nessa dissertação demonstram que a inosina (1 e 10 mg/kg) inibiu a severidade e a progressão da EAE, associado ao bloqueio do processo neuroinflamatório e desmielinizante. Cabe ressaltar o efeito da dose de 1mg/kg de inosina, a qual se mostrou mais eficaz em retardar o surgimento dos sinais clínicos como também em proteger o tecido nervoso da desmielinização. Ademais, o efeito neuroprotetor e anti-hiperalgésico da inosina na dose de 1mg/kg parece estar relacionado à inibição da atividade astrocitária, juntamente com a redução dos níveis de IL-17 em tecidos linfóides periféricos. Esses resultados muito provavelmente foram obtidos através da modulação dos receptores adenosinérgicos - A2A, de maneira independente de ERK1, no SNC. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer sobre quais células a ação moduladora da inosina sobre o A2AR ocorre gerando os efeitos neuroprotetores obtidos. Desse modo, cabe avaliar o efeito da inosina nas diferentes vias de sinalização relacionadas ao A2AR, tais como PI3K/NF- κ B ou PKA/CREB.

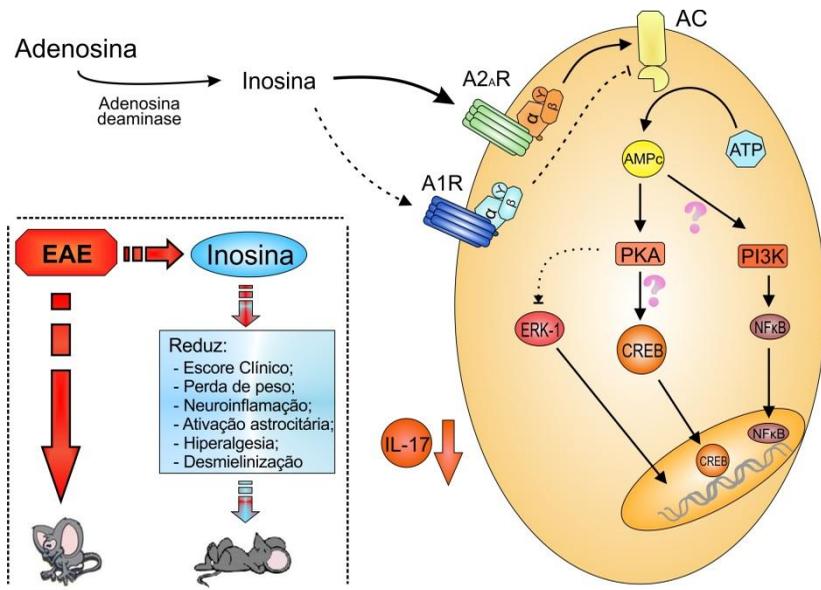


Figura 19 - Representação esquemática dos efeitos obtidos pelo tratamento preventivo com inosina no modelo experimental de EM. A inosina surge como metabólito da adenosina por ação da enzima adenosina deaminase. O tratamento preventivo com inosina durante a EAE, modelo experimental de EM, inibiu o desenvolvimento e a progressão da doença. Além dos escores clínicos, a inosina inibiu a perda de peso e a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio induzidas pela EAE. Por fim, a neuroinflamação bloqueada pela inosina juntamente com o processo desmielinizante. Em conjunto, o efeito imunomodulador e anti-hiperalgésico obtido pela inosina correlaciona-se ao seu efeito inibitório na atividade astrocitária, como também na produção da interleucina encefalitogênica - IL-17 - nos órgãos linfoides secundários. Visto que a inosina atua sobre receptores adenosinérgicos, sugere-se que o efeito imunomodulador deve a sua ação no A2AR sem afetar, efetivamente, o A1R no SNC, independente da ativação de ERK1. EAE – encefalomielite autoimune experimental, A1R – receptor adenosinérgico A1, A2AR – receptor adenosinérgico A2A, AC – adenilado ciclase, ATP – adenosina tri-fosfato, AMPc – adenosina monofosfato cíclico, PKA – proteína cinase A, PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase, ERK1 – cinase reguladora de sinal extracelular, CREB – proteína ligante de elemento responsivo ao AMPc, NF-κB – fator nuclear kappa B, IL-17 – interleucina 17. Fonte: A autora.

REFERÊNCIAS

- ACHARJEE, S. *et al.* Altered cognitive-emotional behavior in early experimental autoimmune encephalitis-cytokine and hormonal correlates. **Brain Behav Immun.** 33:164-72, 2013.
- AGRAWAL, A. *et al.* ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol.** 176: 5788-96, 2006.
- ALAM, M. S. *et al.* A2A adenosine receptor (AR) activation inhibits pro-inflammatory cytokine production by human CD4+ helper T cells and regulates Helicobacter-induced gastritis and bacterial persistence. **Mucosal Immunol.** 2:232-42, 2009.
- ALBRIGHT, A. V. *et al.* The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. **J Neurovirol.** 4:486-94, 1998.
- ANDERSSON, P. B. *et al.* Multiple sclerosis that is progressive from the time of onset: clinical characteristics and progression of disability. **Arch Neurol.** 56:1138-42, 1999.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. **Ann Neurol.** 61:288-99, 2007.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L.; SIMON, K. C. Vitamin D and multiple sclerosis. **Lancet Neurol.** 9:599-612, 2010.
- ASGHARI, A. A. *et al.* Adenosine A1 receptor agonist, N6-cyclohexyladenosine, protects myelin and induces remyelination in an experimental model of rat optic chiasm demyelination; electrophysiological and histopathological studies. **J Neurol Sci.** 325:22-8, 2013.
- BABBE, H. *et al.* Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. **J Exp Med.** 192:393-404, 2000.
- BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **J Neurosci.** 21:6480-91, 2001.
- BECK, R. W. *et al.* The effect of corticosteroids for acute optic neuritis on the subsequent development of multiple sclerosis. The Optic Neuritis Study Group. **N Engl J Med.** 329:1764-9, 1993.

BELFRAGE, M. *et al.* Systemic adenosine infusion alleviates spontaneous and stimulus evoked pain in patients with peripheral neuropathic pain. **Anesth Analg.** 81:713-7, 1995.

BERMEL, R. A. *et al.* Predictors of long-term outcome in multiple sclerosis patients treated with interferon beta. **Ann Neurol.** 73:95-103, 2013.

BHALLA, A. K. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. **J Immunol.** 133:1748-54, 1984.

BITSCH, A. *et al.* Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. **Brain.** 123:1174-83, 2000.

BLAHOVA DUSANKOVA, J. *et al.* Cost of multiple sclerosis in the Czech Republic: the COMS study. **Mult Scler.** 18:662-8, 2012.

BORTALANZA, L. B. *et al.* Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur J Pharmacol.** 453:203-8, 2002.

BRERETON, C. F. *et al.* Inhibition of ERK MAPK suppresses IL-23- and IL-1-driven IL-17 production and attenuates autoimmune disease. **J Immunol.** 183:1715-23, 2009.

BRINKMANN, V. FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. **Br J Pharmacol.** 158:1173-82, 2009.

BRUCKLACHER-WALDERT, V. *et al.* Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. **Brain.** 132:3329-41, 2009.

BRUNTON, L. L. Immunomodulators. In: LAZO JS, P. K. (Ed.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** New York: McGraw-Hill Medical. 11:1424-1427, 2005.

BRUSAFERRI, F.; CANDELISE, L. Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **J Neurol.** 247:435-42, 2000.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev.** 24:509-81, 1972.

_____. Purinergic signalling. **Br J Pharmacol.** 147:172-81, 2006.

_____. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev.** 87:659-797, 2007.

CAIRNS, B. E. Peripheral receptor targets for analgesia: novel approaches to pain management. **Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.** 541, 2009.

- CAN, A. *et al.* The tail suspension test. **J Vis Exp.** 59:3769, 2012.
- CANTORNA, M. T.; HAYES, C. E.; DELUCA, H. F. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 93:7861-4, 1996.
- CARLSON, T. *et al.* The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. **J Exp Med.** 205:811-23, 2008.
- CARRITHERS, M. D. Update on Disease-Modifying Treatments for Multiple Sclerosis. **Clin Ther.** 2014.
- CHALLONER, P. B. *et al.* Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92:7440-4, 1995.
- CHASTAIN, E. M. L.; MILLER, S. D. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. **Immunol Rev.** 245:227-238, 2012.
- CHEN, P. *et al.* Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99:9031-6, 2002.
- CHERWINSKI, H. M. *et al.* The immunosuppressant leflunomide inhibits lymphocyte proliferation by inhibiting pyrimidine biosynthesis. **J Pharmacol Exp Ther.** 275:1043-9, 1995.
- CHUN, J.; HARTUNG, H. P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. **Clin Neuropharmacol.** 33:91-101, 2010.
- CHWASTIAK, L. *et al.* Depressive symptoms and severity of illness in multiple sclerosis: epidemiologic study of a large community sample. **Am J Psychiatry.** 159:1862-8, 2002.
- CIPRIANI, S.; BAKSHI, R.; SCHWARZSCHILD, M. A. Protection by inosine in a cellular model of Parkinson's disease. **Neuroscience.** 274:242-9, 2014.
- CLIFFORD, D. B., TROTTER, J.L. Pain in multiple sclerosis. **Arch Neurol.** 41:1270-1272, 1984.
- COLLIN, C. *et al.* Randomized controlled trial of cannabis-based medicine in spasticity caused by multiple sclerosis. **Eur J Neurol.** 14:290-6, 2007.
- COMABELLA, M.; KHOURY, S. J. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Clin Immunol.** 142:2-8, 2012.
- COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **Lancet.** 372:1502-17, 2008.

COMPSTON, D. A.; BATCHELOR, J. R.; MCDONALD, W. I. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. **Lancet**. 2:1261-5, 1976.

CONFAVREUX, C. *et al.* Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. **N Engl J Med**. 343:1430-8, 2000.

COX, A. L. *et al.* Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis. **Eur J Immunol**. 35:3332-42, 2005.

CREE, B. A. C. Multiple sclerosis. **Current Diagnosis and Treatment in Neurology**. JCM, B. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical 2007.

CRISTIANO, E.; PATRUCCO, L.; ROJAS, J. I. A systematic review of the epidemiology of multiple sclerosis in South America. **Eur J Neurol**. 15:1273-8, 2008.

CUNY, G. D. Kinase inhibitors as potential therapeutics for acute and chronic neurodegenerative conditions. **Curr Pharm Des**. 15:3919-39, 2009.

DA ROCHA LAPA, F. *et al.* Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A2 receptors. **Purinergic Signal**. 8:693-704, 2012.

DA ROCHA LAPA, F. *et al.* Anti-inflammatory effects of inosine in allergic lung inflammation in mice: evidence for the participation of adenosine A2A and A3 receptors. **Purinergic Signal**. 9:325-36, 2013.

DAY, Y. J. *et al.* Lack of interleukin-17 leads to a modulated micro-environment and amelioration of mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. **Pain**. 155:1293-302, 2014.

DHIB-JALBUT, S.; MARKS, S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. **Neurology**. 74:17-24, 2010.

DIAS, R. B. *et al.* Adenosine: setting the stage for plasticity. **Trends Neurosci**. 36:248-57, 2013.

DIXON, A. K. *et al.* Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **Br J Pharmacol**. 118:1461-8, 1996.

DOCKRELL, D. H.; SMITH, T. F.; PAYA, C. V. Human herpesvirus 6. **Mayo Clin Proc**. 74:163-70, 1999.

DU, C.; XIE, X. G protein-coupled receptors as therapeutic targets for multiple sclerosis. **Cell Res**. 22:1108-28, 2012.

DU PASQUIER, R. A.; PINSCHOWER, D. D.; MERKLER, D. Immunological mechanism of action and clinical profile of disease-modifying treatments in multiple sclerosis. **CNS Drugs**. 28:535-58, 2014.

DUTRA, R. C. *et al.* The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: evidence for the involvement of astrocytes. **Neurobiol Dis**. 54:82-93, 2013a.

DUTRA, R. C. *et al.* The role of kinin receptors in preventing neuroinflammation and its clinical severity during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **PLoS One**. 6:27875, 2011.

DUTRA, R. C. *et al.* Spatial reference memory deficits precede motor dysfunction in an experimental autoimmune encephalomyelitis model: the role of kallikrein-kinin system. **Brain Behav Immun**. 33:90-101, 2013b.

ELLWARDT, E.; ZIPP, F. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. **Exp Neurol**, 2014.

ENGELHARDT., B. T cell migration into the central nervous system during health and disease: Different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. **Clin Exp Neuroimmunol**. 1:79-93, 2010.

FAROOQI, N.; GRAN, B.; CONSTANTINESCU, C. S. Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? **J Neurochem**. 115:829-44, 2010.

FARSANI, Z. S.; BEHMANESH, M.; SAHRAIAN, M. A. Interleukin-10 but not transforming growth factor-beta1 gene expression is up-regulated by vitamin D treatment in multiple sclerosis patients. **J Neurol Sci**. 350:18-23, 2015.

FDA, F. A. D. A. Mitoxantrone US prescribing information. 2010a. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov>>. Acesso em: 15 de out 2014.

_____. FDA approves first oral drug to reduce MS relapses. 2010b. Disponível em: <<http://www.fda.gov>> Acesso em: 15 de out 2014.

_____. Tysabri US prescribing information., 2012. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov>>. Acesso em: 15 de out 2014.

_____. FDA approves new multiple sclerosis treatment: Tecfidera. 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 02 de junho 2014.

FEDERATION, M. S. I. Atlas of MS 2013. 2013. Disponível em: <<http://www.atlasofms.org/>>. Acesso em: 23 de maio.

FEINSTEIN, A. *et al.* Clinically isolated lesions of the type seen in multiple sclerosis: a cognitive, psychiatric, and MRI follow up study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 55:869-76, 1992.

FEINSTEIN, A. *et al.* The link between multiple sclerosis and depression. **Nat Rev Neurol**. 10:507-17, 2014.

FLACHENECKER, P. *et al.* Cytokine mRNA expression in patients with multiple sclerosis and fatigue. **Mult Scler**. 10:165-9, 2004.

FOROOGHIAN, F. *et al.* Enolase and arrestin are novel nonmyelin autoantigens in multiple sclerosis. **J Clin Immunol**. 27:388-96, 2007.

FREDHOLM, B. B. *et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**. 53:527-52, 2001.

FROHMAN, E. M.; RACKE, M. K.; RAINE, C. S. Medical progress: Multiple sclerosis - The plaque and its pathogenesis. **N Engl J Med**. 354:942-955, 2006.

FYFFE-MARICICH, S. L. *et al.* Signaling through ERK1/2 controls myelin thickness during myelin repair in the adult central nervous system. **J Neurosci**. 33:18402-8, 2013.

GAJOFATTO, A. *et al.* Switching first-line disease-modifying therapy after failure: impact on the course of relapsing-remitting multiple sclerosis. **Mult Scler**. 15:50-8, 2009.

GALLIEN, P. *et al.* Multidisciplinary management of multiple sclerosis symptoms. **Eur Neurol**. 72:20-5, 2014.

GARCIA, G. E. *et al.* Adenosine A2A receptor activation and macrophage-mediated experimental glomerulonephritis. **FASEB J**. 22:445-54, 2008.

GARRINGTON, T. P.; JOHNSON, G. L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Curr Opin Cell Biol**. 11:211-8, 1999.

GESSI, S. *et al.* A(1) and A(3) adenosine receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes. **Pharmacol Res**. 76:157-70, 2013.

GLENNIE, M. J. *et al.* Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. **Mol Immunol**. 44:3823-37, 2007.

GOLDENBERG, M. M. Multiple sclerosis review. **P T**. 37:175-84, 2012.

- GOODIN, D. S. The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. **PLoS One**. 4:4565, 2009.
- GORETTI, B. *et al.* Anxiety state affects information processing speed in patients with multiple sclerosis. **Neurol Sci**. 35:559-63, 2014.
- GRAN, B., O'BRIEN, K., FITZGERALD, D., & ROSTAMI, A.A.M. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**. Springer: Heidelberg: 356-377 p. 2007.
- GREEN, P. J.; SULS, J. The effects of caffeine on ambulatory blood pressure, heart rate, and mood in coffee drinkers. **J Behav Med**. 19:111-28, 1996.
- HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **J Clin Invest**. 113:788-794, 2004.
- HAJI, N. *et al.* TNF-alpha-mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. **Exp Neurol**. 237:296-303, 2012.
- HANDEL, A. E. *et al.* An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. **PLoS One**. 5:e12496, 2010.
- HASELKORN, M. L. *et al.* Adenosine A1 receptor activation as a brake on the microglial response after experimental traumatic brain injury in mice. **J Neurotrauma**. 27:901-10, 2010.
- HASKELL, C. F. *et al.* Cognitive and mood improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine. **Psychopharmacology (Berl)**. 179:813-25, 2005.
- HASKO, G. *et al.* Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. **J Immunol**. 164:1013-9, 2000.
- HASKO, G.; SITKOVSKY, M. V.; SZABO, C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. **Trends Pharmacol Sci**. 25:152-7, 2004.
- HAUSER, D. N.; HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiol Dis**. 51:35-42, 2013.
- HAUSER SL, G. D. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. In: (Ed.). **Harrison's Principles of Internal Medicine**. New York: McGraw-Hill Medical. 2:2611-2621, 2008.
- HEDEGAARD, C. J. *et al.* T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. **Immunology**. 125:161-9, 2008.

HEDSTROM, A. K. *et al.* Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. **Neurology**. 73:696-701, 2009.

HERNAN, M. A.; OLEK, M. J.; ASCHERIO, A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. **Am J Epidemiol**. 154:69-74, 2001.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **Am J Clin Nutr**. 79:362-71, 2004.

HOLMAN, D. W.; KLEIN, R. S.; RANSOHOFF, R. M. The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. **Biochim Biophys Acta**. 1812:220-30, 2011.

HOOPER, D. C. *et al.* Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 94:2528-33, 1997.

HOOPER, D. C. *et al.* Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 95:675-680, 1998.

HORTON, R. *et al.* Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. **Immunogenetics**. 60:1-18, 2008.

HUANG, S. *et al.* Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. **Blood**. 90:1600-10, 1997.

JAIN, N. *et al.* Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. **Br J Pharmacol**. 116:2127-33, 1995.

JIN, H. M.; WEI, P. Anti-fatigue properties of tartary buckwheat extracts in mice. **Int J Mol Sci**. 12:4770-80, 2011.

JOHNSON, A. J. *et al.* The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology? **Int Rev Neurobiol**. 79:73-97, 2007.

JOHNSTON, J. B. *et al.* Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis. **Ann Neurol**. 49:650-8, 2001.

JUHASNAGY, A.; AVIADO, D. M. Inosine as a Cardiogenic Agent That Reverses Adrenergic Beta-Blockade. **J Pharmacol Exp Ther**. 202:683-695, 1977.

KALA, M.; MIRAVALLE, A.; VOLLMER, T. Recent insights into the mechanism of action of glatiramer acetate. **J Neuroimmunol**. 235:9-17, 2011.

KANDEL, E. R. *Principals of Neural Science. Nerve Cells and Behavior*. New York: McGraw-Hill. 20-35, 2000.

KASTER, M. P. *et al.* The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A1 and A2A receptors. **Purinergic Signal**. 9:481-6, 2013.

KASTER, M. P. *et al.* Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. **Neurosci Lett**. 355:21-4, 2004.

KEBIR, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nat Med**. 13:1173-5, 2007.

KIM, C. F.; MOALEM-TAYLOR, G. Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice. **J Pain**. 12:370-83, 2011.

KIM, D. *et al.* Inosine enhances axon sprouting and motor recovery after spinal cord injury. **PLoS One**. 8:e81948, 2013.

KIM, J. S. *et al.* Detection of human herpesvirus 6 variant A in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. **Eur Neurol**. 43:170-3, 2000.

KIPP, M. *et al.* Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS exposure. **J Mol Neurosci**. 35:235-43, 2008.

KLEINZELLER, A. Adenosine- and inosine-nucleotides in the phosphorus metabolism of muscle. **Biochem J**. 36:729-36, 1942.

KOCH, M. W. *et al.* Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. **J Neurol Sci**. 324:10-16, 2013.

KOMIYAMA, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**. 177:566-73, 2006.

KONG, W. *et al.* Selective CB2 receptor activation ameliorates EAE by reducing Th17 differentiation and immune cell accumulation in the CNS. **Cell Immunol**. 287:1-17, 2014.

KOROSTIL, M.; FEINSTEIN, A. Anxiety disorders and their clinical correlates in multiple sclerosis patients. **Mult Scler**. 13:67-72, 2007.

KRECKLER, L. M. *et al.* Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. **J Pharmacol Exp Ther**. 317:172-80, 2006.

KROENCKE, D. C.; LYNCH, S. G.; DENNEY, D. R. Fatigue in multiple sclerosis: relationship to depression, disability, and disease pattern. **Mult Scler.** 6:131-6, 2000.

KULKARNI, S. K.; SINGH, K.; BISHNOI, M. Involvement of adenosinergic receptors in anxiety related behaviours. **Indian J Exp Biol.** 45:439-43, 2007.

KURICOVA, M. *et al.* Oral administration of inosine promotes recovery after experimental spinal cord injury in rat. **Neurol Sci.** 35:1785-91, 2014.

KURTZKE, J. F.; BEEBE, G. W.; NORMAN, J. E., JR. Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. **Neurology.** 29:1228-35, 1979.

LANGFORD, R. M. *et al.* A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. **J Neurol.** 260:984-97, 2013.

LAPPAS, C. M.; RIEGER, J. M.; LINDEN, J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. **J Immunol.** 174:1073-80, 2005.

LASSMANN, H.; VAN HORSSSEN, J.; MAHAD, D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. **Nat Rev Neurol.** 8:647-56, 2012.

LEAL, R. B. *et al.* Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicol Appl Pharmacol.** 178:44-51, 2002.

LEHMANN, J. C. *et al.* Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. **J Invest Dermatol.** 127:835-45, 2007.

LI, S. *et al.* Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na⁺-dependent glutamate transport. **J Neurosci.** 19:RC16, 1999.

LIBBEY, J. E.; MCCOY, L. L.; FUJINAMI, R. S. Molecular mimicry in multiple sclerosis. **Int Rev Neurobiol.** 79:127-47, 2007.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 41:775-787, 2001.

LINK, H.; HUANG, Y. M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. **J Neuroimmunol.** 180:17-28, 2006.

- LINKER, R. A. *et al.* Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Brain**. 134:678-92, 2011.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**. 92:180-5, 1987.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. 137:473-7, 2008.
- LORAM, L. C. *et al.* Intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists reversed neuropathic allodynia through protein kinase (PK)A/PKC signaling. **Brain Behav Immun**. 33:112-22, 2013.
- LU, J. *et al.* Pain in experimental autoimmune encephalitis: a comparative study between different mouse models. **J Neuroinflammation**. 9:233, 2012.
- MABLEY, J. G. *et al.* Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 284:G138-44, 2003a.
- MABLEY, J. G. *et al.* Inosine protects against the development of diabetes in multiple-low-dose streptozotocin and nonobese diabetic mouse models of type 1 diabetes. **Mol Med**. 9:96-104, 2003.
- MAHAD, D. *et al.* Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. **Brain**. 131:1722-35, 2008.
- MARESZ, K. *et al.* Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. **Nat Med**. 13:492-7, 2007.
- MARKOWITZ, C. E. *et al.* . The treatment of multiple sclerosis with inosine. **J Altern Complement Med**. 15:619-25, 2009.
- MARKVARDSEN, L. H. *et al.* Subcutaneous immunoglobulin in responders to intravenous therapy with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. **Eur J Neurol**. 20:836-842, 2013.
- MARTON, A. *et al.* Anti-inflammatory effects of inosine in human monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. **Int J Mol Med**. 8:617-21, 2001.
- MATSUMOTO, N.; KOMIYAMA, S.; AKAIKE, N. Pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. **J Physiol**. 541:511-20, 2002.

MATUSEVICIUS, D. *et al.* Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Mult Scler.** 5:101-4, 1999.

MATUTE, C.; CAVALIERE, F. Neuroglial interactions mediated by purinergic signalling in the pathophysiology of CNS disorders. **Semin Cell Dev Biol.** 22:252-9, 2011.

MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nature Immunol.** 8:913-919, 2007.

MCNAUGHTON, L.; DALTON, B.; TARR, J. Inosine supplementation has no effect on aerobic or anaerobic cycling performance. **Int J Sport Nutr.** 9:333-44, 1999.

MCRAE, B. L. *et al.* Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Exp Med.** 182:75-85, 1995.

MECHA, M. *et al.* Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: A role for A(2A) receptors. **Neurobiol Dis.** 59:141-150, 2013.

MEESON, A. P. *et al.* The distribution of inflammatory demyelinated lesions in the central nervous system of rats with antibody-augmented demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. **Exp Neurol.** 129:299-310, 1994.

MICHOT, C. *et al.* Exome Sequencing Identifies PDE4D Mutations as Another Cause of Acrodysostosis. **Am J Hum Genet.** 90:740-745, 2012.

MICU, I. *et al.* NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. **Nature.** 439:988-92, 2006.

MILLS, J. H. *et al.* A2A adenosine receptor signaling in lymphocytes and the central nervous system regulates inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol.** 188:5713-22, 2012.

MILO, R. The efficacy and safety of daclizumab and its potential role in the treatment of multiple sclerosis. **Ther Adv Neurol Disord.** 7:7-21, 2014.

MOHARREGH-KHIABANI, D. *et al.* Effects of fumaric acids on cuprizone induced central nervous system de- and remyelination in the mouse. **PLoS One.** 5:e11769, 2010.

MONTES, M. *et al.* Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. **Clin Immunol.** 130:133-44, 2009.

- MORALES, Y.; PARISI, J. E.; LUCCHINETTI, C. F. The pathology of multiple sclerosis: evidence for heterogeneity. **Adv Neurol.** 98:27-45, 2006.
- MOREIRA, M. A. *et al.* Historical aspects of multiple sclerosis. **Rev Neurol.** 34:378-383, 2002.
- MORENO TORRES, I.; SANCHEZ, A. J.; GARCIA-MERINO, A. Evaluation of the tolerability and efficacy of Sativex in multiple sclerosis. **Expert Rev Neurother.** 14:1243-50, 2014.
- MORRISSEY, S. P.; LE PAGE, E.; EDAN, G. Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. **Int MS J.** 12:74-87, 2005.
- MOSMANN, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol.** 136:2348-57, 1986.
- MUMFORD, C. J. *et al.* The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. **Neurology.** 44:11-5, 1994.
- MUNGER, K. L. *et al.* Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. **Neurology.** 62:60-5, 2004.
- MUTO, J. *et al.* Oral administration of inosine produces antidepressant-like effects in mice. **Sci Rep.** 4:4199, 2014.
- NACI, H. *et al.* Economic burden of multiple sclerosis: a systematic review of the literature. **Pharmacoeconomics.** 28:363-79, 2010.
- NASCIMENTO, F. P. *et al.* Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. **J Pharmacol Exp Ther.** 334:590-8, 2010.
- NASCIMENTO, F. P. *et al.* Adenosine A1 Receptor-Dependent Antinociception Induced by Inosine in Mice: Pharmacological, Genetic and Biochemical Aspects. **Mol Neurobiol.** 1-11, 2014.
- NAVE, K. A. Myelination and support of axonal integrity by glia. **Nature.** 468:244-52, 2010.
- NYLANDER, A.; HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **J Clin Invest.** 122:1180-8, 2012.
- O'CONNOR, K. C. *et al.* Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. **J Immunol.** 175:1974-82, 2005.

Ó DONNCHADHA, S. *et al.* Symptom overlap in anxiety and multiple sclerosis. **Mult Scler.** 19:1349-54, 2013.

OHGURO, H. *et al.* Beta-arrestin and arrestin are recognized by autoantibodies in sera from multiple sclerosis patients. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 90:3241-5, 1993.

OLECHOWSKI, C. J.; TRUONG, J. J.; KERR, B. J. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Pain.** 141:156-64, 2009.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int J Dev Neurosci.** 26:355-62, 2008.

ONTANEDA, D.; HYLAND, M.; COHEN, J. A. Multiple Sclerosis: New Insights in Pathogenesis and Novel Therapeutics. **Annu Rev Med.** 63:389-404, 2012.

OSTERBERG, A.; BOIVIE, J. Central pain in multiple sclerosis - sensory abnormalities. **Eur J Pain.** 14:104-10, 2010.

OSTERBERG, A.; BOIVIE, J.; THUOMAS, K. A. Central pain in multiple sclerosis--prevalence and clinical characteristics. **Eur J Pain.** 9:531-42, 2005.

PALAZUELOS, J. *et al.* The CB(2) cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. **J Biol Chem.** 283:13320-9, 2008.

PAPARRIGOPOULOS, T. *et al.* The neuropsychiatry of multiple sclerosis: focus on disorders of mood, affect and behaviour. **Int Rev Psychiatry.** 22:14-21, 2010.

PARK, K. S. *et al.* Modulation of N-type Ca²⁺ currents by A1-adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons. **J Pharmacol Exp Ther.** 299:501-8, 2001.

PATERNITI, I. *et al.* Selective adenosine A2A receptor agonists and antagonists protect against spinal cord injury through peripheral and central effects. **J Neuroinflammation.** 8:31, 2011.

PERUGA, I. *et al.* Inflammation modulates anxiety in an animal model of multiple sclerosis. **Behav Brain Res.** 220:20-9, 2011.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem.** 83:346-56, 1977.

PIERROT-DESEILLIGNY, C. Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis. **J Neurol.** 256:1468-79, 2009.

- PIKE, J. *et al.* Social and economic burden of walking and mobility problems in multiple sclerosis. **BMC Neurol.** 12:94, 2012.
- PINTOR, A. *et al.* Adenosine A_{2A} receptor antagonists prevent the increase in striatal glutamate levels induced by glutamate uptake inhibitors. **J Neurochem.** 89:152-6, 2004.
- PIRAS, G. *et al.* Emotional change-associated T cell mobilization at the early stage of a mouse model of multiple sclerosis. **Front Immunol.** 4:400, 2013.
- PITT, D.; WERNER, P.; RAINE, C. S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. **Nat Med.** 6:67-70, 2000.
- PODBIELSKA, M. *et al.* Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination. **Brain Sci.** 3:1282-324, 2013.
- PODER, K. *et al.* Social anxiety in a multiple sclerosis clinic population. **Mult Scler.** 15:393-8, 2009.
- POLLAK, Y. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis-associated behavioral syndrome as a model of 'depression due to multiple sclerosis'. **Brain Behav Immun.** 16:533-43, 2002.
- POSSER, T. *et al.* Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Arch Toxicol.** 81:407-14, 2007.
- QI, B. *et al.* Anti-fatigue effects of proteins isolated from Panax quinquefolium. **J Ethnopharmacol.** 153:430-4, 2014.
- QIN, Y. *et al.* Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. **J Clin Invest.** 102:1045-50, 1998.
- QUINTANILLA, R. A.; JOHNSON, G. V. Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. **Brain Res Bull.** 80:242-7, 2009.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev.** 50:413-492, 1998.
- RAMAGOPALAN, S. V. *et al.* Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. **Lancet Neurology.** 9:727-739, 2010.
- RAMAGOPALAN, S. V.; EBERS, G. C. Epistasis: multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. **Neurology.** 72:566-7, 2009.

RAMAGOPALAN, S. V. *et al.* The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. **PLoS Genet.** 3:1607-13, 2007.

READING, S. A.; BARCLAY, J. K. A1 receptor activation decreases fatigue in mammalian slow-twitch skeletal muscle in vitro. **Can J Physiol Pharmacol.** 79:496-501, 2001.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M.; DE MENDONCA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog Neurobiol.** 68:377-92, 2002.

RICE, G. P.; HARTUNG, H. P.; CALABRESI, P. A. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. **Neurology.** 64:1336-42, 2005.

RISSANEN, E. *et al.* Adenosine A2A receptors in secondary progressive multiple sclerosis: a [(11)C]TMSX brain PET study. **J Cereb Blood Flow Metab.** 33:1394-401, 2013.

RISTORI, G. *et al.* Multiple sclerosis in twins from continental Italy and Sardinia: a nationwide study. **Ann Neurol.** 59:27-34, 2006.

RIVERA, V. M. *et al.* Multiple sclerosis care in Latin America. **Neurology.** 82:1660-1, 2014.

ROBERTSON, N. P. *et al.* Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. **Brain.** 119:449-55, 1996.

RODRIGUES, D. H. *et al.* Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Arq Neuropsiquiatr.** 69:938-42, 2011.

ROG, D. J.; NURMIKKO, T. J.; YOUNG, C. A. Oromucosal delta9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol for neuropathic pain associated with multiple sclerosis: an uncontrolled, open-label, 2-year extension trial. **Clin Ther.** 29:2068-79, 2007.

RUBIN, S. M. Management of cognition and fatigue. **Dis Mon.** 59:269-72, 2013a.

_____. Management of multiple sclerosis: an overview. **Dis Mon.** 59:253-60, 2013b.

RUNIA, T. F. *et al.* Lower serum vitamin D levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis. **Neurology.** 79:261-6, 2012.

SADOVNICK, A. D. *et al.* Depression and multiple sclerosis. **Neurology.** 46:628-32, 1996.

- SANOFLI. Aubagio US prescribing information. 2012. Disponível em: <<http://products.sanofi.us/aubagio/aubagio.pdf>>. Acesso em: 16 de out 2014.
- SAWCER, S.; FRANKLIN, R. J.; BAN, M. Multiple sclerosis genetics. **Lancet Neurol.** 13:700-9, 2014.
- SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **Eur J Pharmacol.** 347:1-11, 1998.
- SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Progr Neurobiol.** 69:313-340, 2003.
- SCHMITZ, K. *et al.* R-flurbiprofen attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **EMBO Mol Med.** 6:1398-422, 2014.
- SCHREMPF, W.; ZIEMSEN, T. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. **Autoimmun Rev.** 6:469-75, 2007.
- SCLEROSIS., F. R. G. O. M. Multiple sclerosis in 54 twinships: concordance rate is independent of zygosity. **Ann Neurol.** 32:724-27, 1992.
- SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. **Handb Exp Pharmacol.** 7:471-534, 2009.
- SELMİ, C. The X in sex: how autoimmune diseases revolve around sex chromosomes. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** 22:913-22, 2008.
- SHABGAH, A. G.; FATTAHI, E.; SHAHNEH, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. **Postepy Dermatol Alergol.** 31:256-61, 2014.
- SHIN, T. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol.** 140:118-25, 2003.
- SHIRAZI, H. A. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D enhances neural stem cell proliferation and oligodendrocyte differentiation. **Exp Mol Pathol.** 98:240-245, 2015.
- SIMPSON, S., JR. *et al.* Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 82:1132-41, 2011.
- SIMPSON, S., JR. *et al.* Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. **Ann Neurol.** 68:193-203, 2010.
- SKULINA, C. *et al.* Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 101:2428-33, 2004.

SMITH-BOUVIER, D. L. *et al.* A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. **J Exp Med.** 205:1099-108, 2008.

SPACH, K. M. *et al.* IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol.** 177:6030-7, 2006.

SPTSIN, S. *et al.* Inactivation of peroxynitrite in multiple sclerosis patients after oral administration of inosine may suggest possible approaches to therapy of the disease. **Mult Scler.** 7:313-319, 2001.

SRINIVASAN, R. *et al.* Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. **Brain.** 128:1016-25, 2005.

STARLING, R. D. *et al.* Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. **Med Sci Sports Exerc.** 28:1193-8, 1996a.

STARLING, R. D. *et al.* Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. **Med Sci Sports Exerc.** 28:1193-1198, 1996b.

STENAGER, E.; KNUDSEN, L.; JENSEN, K. Acute and chronic pain syndromes in multiple sclerosis. A 5-year follow-up study. **Ital J Neurol Sci.** 16:629-32, 1995.

STOJANOVICH, L. Stress and autoimmunity. **Autoimmun Rev.** 9:A271-6, 2010.

STONE, T. W.; CERUTI, S.; ABBRACCHIO, M. P. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. **Handb Exp Pharmacol.** 193:535-87, 2009.

STROMNES, I. M. *et al.* Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. **Nat Med.** 14:337-42, 2008.

STROMNES, I. M.; GOVERMAN, J. M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nat Protoc.** 1:1810-1819, 2006.

_____. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nat Protoc.** 1:1810-9, 2006a.

_____. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nat Protoc.** 1:1952-60, 2006b.

STUVE, O. *et al.* Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. **Ann Neurol.** 40:853-63, 1996.

- SU, K. Y. *et al.* Rutin, a flavonoid and principal component of saussurea involucrata, attenuates physical fatigue in a forced swimming mouse model. **Int J Med Sci.** 11:528-37, 2014.
- SVENDSEN, K. B. *et al.* Sensory function and quality of life in patients with multiple sclerosis and pain. **Pain.** 114:473-81, 2005.
- SVENDSEN, K. B. *et al.* Pain in patients with multiple sclerosis: a population-based study. **Arch Neurol.** 60:1089-94, 2003.
- TAKATSU-COLEMAN, A. L. *et al.* Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: mood-congruent memory in male mice? **J Psychiatry Neurosci.** 38:259-68, 2013.
- TAN, J. *et al.* Ligation of microglial CD40 results in p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF-alpha production that is opposed by TGF-beta 1 and IL-10. **J Immunol.** 163:6614-21, 1999.
- TANUMA, N.; SHIN, T.; MATSUMOTO, Y. Characterization of acute versus chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in DA rats. **J Neuroimmunol.** 108:171-80, 2000.
- TOMASELLI, B. *et al.* Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 MAPK activation. **Neurochem Int.** 46:513-521, 2005.
- TONCEV, G. Therapeutic value of serum uric acid levels increasing in the treatment of multiple sclerosis. **Vojnosanit Pregl.** 63:879-82, 2006.
- TORTORELLA, P. *et al.* Determinants of disability in multiple sclerosis: an immunological and MRI study. **Biomed Res Int.** 2014:875768, 2014.
- TSUTSUI, S. *et al.* A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. **J Neurosci.** 24:1521-9, 2004.
- TSUTSUI, S. *et al.* Glucocorticoids regulate innate immunity in a model of multiple sclerosis: reciprocal interactions between the A1 adenosine receptor and beta-arrestin-1 in monocytoid cells. **FASEB J.** 22:786-96, 2008.
- TZARTOS, J. S. *et al.* Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am J Pathol.** 172:146-55, 2008.
- VAN ASCH, P. Impact of mobility impairment in multiple sclerosis 2—patient perspectives. **Eur Neurol Rev.** 6:115-120, 2011.

VANDERMEEREN, M. *et al.* Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 234:19-23, 1997.

VIGLIETTA, V. *et al.* Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **J Exp Med.** 199:971-9, 2004.

VINCENZI, F. *et al.* Multiple sclerosis lymphocytes upregulate A2A adenosine receptors that are antiinflammatory when stimulated. **Eur J Immunol.** 43:2206-16, 2013.

VOSKUHL, R. R. *et al.* Gender differences in autoimmune demyelination in the mouse: implications for multiple sclerosis. **Ann Neurol.** 39:724-33, 1996.

VUGER-KOVACIC, D. *et al.* Relation between anxiety, depression and locus of control of patients with multiple sclerosis. **Mult Scler.** 13:1065-7, 2007.

WADE, D. T. *et al.* Long-term use of a cannabis-based medicine in the treatment of spasticity and other symptoms in multiple sclerosis. **Mult Scler.** 12:639-45, 2006.

WALCZAK, J. S.; BEAULIEU, P. Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: the double plate technique. **Neurosci Lett.** 399:240-4, 2006.

WARWICK, R. A. *et al.* Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neurosci Lett.** 569:59-62, 2014.

WAUBANT, E. *et al.* Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. **Neurology.** 53:1397-401, 1999.

WEISS, J. M. Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? **Psychopharmacology (Berl).** 134:368-70, 1997.

WHITEMAN, M.; HALLIWELL, B. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. **Free Radic Res.** 25:275-83, 1996.

WILLER, C. J. *et al.* A genome-wide scan in forty large pedigrees with multiple sclerosis. **J Hum Genet.** 52:955-62, 2007.

WILLER, C. J. *et al.* Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 100:12877-82, 2003.

WILLIS JR, W. D. Six The Nervous System: Its Peripheral and Central Components **Physiology.** Mosby. 80-99, 2003.

- WU, M. M. *et al.* Effects of inosine on axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. **Neurosci Lett.** 341:84-6, 2003.
- WUCHERPFENNIG, K. W.; STROMINGER, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. **Cell.** 80:695-705, 1995.
- WYATT, A. W. *et al.* Early activation of the p42/p44MAPK pathway mediates adenosine-induced nitric oxide production in human endothelial cells: a novel calcium-insensitive mechanism. **FASEB J.** 16:1584-94, 2002.
- XU, J. *et al.* Additive effect of prostaglandin E2 and adenosine in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 100:30-5, 2013.
- XU, X. *et al.* In vivo mechanism by which leflunomide controls lymphoproliferative and autoimmune disease in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. **J Immunol.** 159:167-74, 1997.
- YAMADA, H. Current perspectives on the role of IL-17 in autoimmune disease. **J Inflamm Res.** 3:33-44, 2010.
- YANG, J. S. *et al.* Laquinimod (ABR-215062) suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, modulates the Th1/Th2 balance and induces the Th3 cytokine TGF-beta in Lewis rats. **J Neuroimmunol.** 156:3-9, 2004.
- YAO, S. Q. *et al.* Genetic inactivation of the adenosine A2A receptor exacerbates brain damage in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neurochem.** 123:100-112, 2012.
- YE, Z. C. *et al.* Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. **J Neurosci.** 23:3588-96, 2003.
- ZAI, L. *et al.* Inosine alters gene expression and axonal projections in neurons contralateral to a cortical infarct and improves skilled use of the impaired limb. **J Neurosci.** 29:8187-97, 2009.
- ZHANG, G. X. *et al.* Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. **J Immunol.** 170:2153-60, 2003.
- ZIMMERMANN, H. *et al.* New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochem Int.** 32:421-5, 1998.