

NATHÁLIA BERNARDES TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CROTOXINA NA
DOR E NOS SINAIS CLÍNICOS DE ANIMAIS
PORTADORES DE ENCEFALOMIELITE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL, UM MODELO
ANIMAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxinologia do Instituto Butantan, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

NATHÁLIA BERNARDES TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CROTOXINA NA
DOR E NOS SINAIS CLÍNICOS DE ANIMAIS
PORTADORES DE ENCEFALOMIELITE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL, UM MODELO
ANIMAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxinologia do Instituto Butantan, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador (a): Dra. Gisele Picolo

São Paulo
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Nathália Bernardes

Avaliação do efeito da crotoxina na dor e sinais clínicos de animais portadores de encefalomielite autoimune experimental, um modelo animais de esclerose múltipla. / Nathália Bernardes Teixeira; Orientadora Gisele Picolo. – São Paulo, 2012.

81fls. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan.

1. Analgesia. 2. *Crotalus* 3. Crotoxina. 4. Dor. 5. Encefalomielite autoimune experimental. I. Orientador (Picolo, Gisele (orient.)). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III. Título.

CDD 615.9

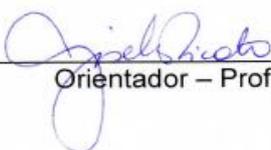
Elaborada com instruções fornecidas pela Biblioteca do Instituto Butantan

DECLARAÇÃO

Eu Nathália Bernardes Teixeira, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, através desta autorizo a divulgação de minha dissertação de mestrado, por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, após defesa.

São Paulo, 24 de outubro de 2012.

Assinatura do aluno: Nathália B. Teixeira

De acordo: 
Orientador – Prof(a) Dr(a) GISELE PICOLO

POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

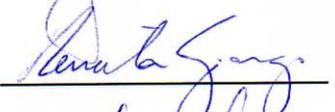
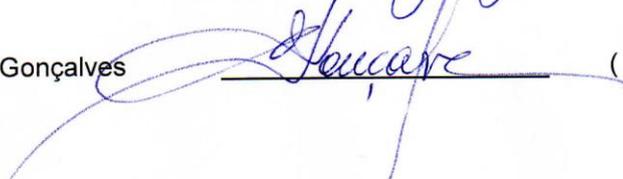
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DA ALUNA: NATHÁLIA BERNARDES TEIXEIRA

DATA DO EXAME: 14/12/2012

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Gisele Picolo (Presidente)		(X)	()
Renata Giorgi		(X)	()
Luís R. Camargo Gonçalves		(X)	()
DECISÃO FINAL: APROVADA (X)		REPROVADA ()	

Comentários da Banca (opcional):

A aluna apresentou o trabalho adequadamente, tendo demonstrado conhecimento e maturidade durante a arguição.
O trabalho é de excelente qualidade e abre perspectivas para novos estudos tanto no doutorado da aluna como para projetos futuros.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

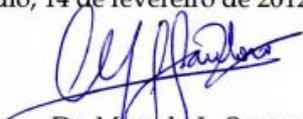
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito da crotoxina na dor e nas alterações imune e dos sinais clínicos de animais portadores de Encefalomielite Autoimune Experimental, um modelo animal de Esclerose Múltipla", **protocolo n° 757/10**, sob a responsabilidade de Gisele Picolo e Nathália Bernardes Teixeira - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 08/02/2012.

We certify that the research entitled "Effect of crotoxin in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis: Evaluation of the nociception, immune system alterations and clinical symptoms", **protocol number 757/10**, under the responsibility of Gisele Picolo and Nathália Bernardes Teixeira - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 02/08/2012.

Vigência do Projeto: 08/2010 - 08/2013	N° de animais/espécie	ADITIVO/OBSERVAÇÃO
Laboratório Especial de Dor e Sinalização	363 camundongos C57BL/6J	Alteração de vigência e Adicional de animais 194 camundongos C57BL/6J (F)

São Paulo, 14 de fevereiro de 2012.


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Lydia e José Elias que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todas as dificuldades, me dando carinho e amor.

Muito Obrigada!

Ao meu noivo Hélio pelo companherismo, compreensão, paciência, amor e carinho, por me ensinar que na vida nem tudo é tão ruim quanto parece e que tudo pode ter um lado positivo.

Obrigada!

A minha Irmã Marina, por aguentar meus momentos de mau humor, por me escutar enquanto ensaio minhas apresentações.

Obrigada!

A minha avó querida Dalila, muito obrigada pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Gisele Picolo pelos ensinamentos, paciência, compreensão, amizade, dedicação e total apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

A colaboradora do meu trabalho Dra. Yara Cury, pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.

A Dra. Sandra Cocuzzo Sampaio Vessoni pela colaboração e pelas proveitosas discussões e ideias com relação ao meu trabalho.

Ao Dr. Alexandre Salgado Basso pela colaboração e disponibilidade de conversarmos sobre os resultados obtidos durante a execução do projeto.

A Lais Aparecida Fonseca, grande amiga e colaboradora, por tornar nossos fins de semana de trabalho mais agradáveis, pela paciência e dedicação para o desenvolvimento deste trabalho.

A Franciele Côrrea Machado, pela amizade, apoio e companherismo.

A Ana Carolina de Almeida, por aguentar minhas cantorias, pela amizade e pelos ótimos conselhos.

Ao Claudemir Domiciliano, por me ajudar a cuidar dos meus animais, pela paciência e simpatia contagiante.

Ao Felipe de Bártolo, pelos momentos de descontração e risadas em dias difíceis.

Ao Leandro Márcio Pereira, pelos momentos altamente filosóficos e enriquecedores, pela amizade e por me escutar sempre que preciso falar.

A todos os alunos e funcionários do Laboratório Especial de Dor e Sinalização que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao apoio financeiro concedido pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos: 2010/12903-7 e 2011/17974-2.

Ao apoio financeiro concedido pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTOX), processo: 2008/57898-0.

*"A tarefa nao é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê."*

(Artur Schopenhauer)

RESUMO

Teixeira, Nathália Bernardes. Avaliação do efeito da crotoxina em animais portadores de encefalomielite autoimune experimental, um modelo animais de esclerose múltipla. 2012. 81 f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

A esclerose múltipla é uma doença inflamatória crônica, de origem autoimune, que acarreta diversas alterações motoras, cognitivas e sensitivas. Dentre as alterações sensitivas, a dor é um dos graves problemas que afetam pessoas portadoras desta doença, interferindo com diversos aspectos da vida do paciente. É importante ressaltar que a esclerose múltipla não tem cura, sendo que a terapêutica se concentra nas ações que retardam a progressão da doença e promovem alívio dos sintomas, melhorando a qualidade de vida do paciente. Apesar da importância da dor nos quadros de esclerose múltipla, poucos estudos experimentais têm sido realizados objetivando caracterizar os mecanismos envolvidos na sua gênese. Este fato decorre da dificuldade de avaliação da nocicepção, uma vez que as alterações motoras que acompanham a doença dificultam e interferem com as respostas dos animais em modelos experimentais de avaliação da sensibilidade dolorosa. Diversos modelos animais de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) têm sido desenvolvidos para tentar reproduzir, em animais, as alterações anatômicas e comportamentais observadas na esclerose múltipla em humanos. Foi demonstrado recentemente que, em modelo de EAE induzida por imunização com MOG₃₅₋₅₅, a hiperalgesia e alodínia, dois fenômenos de sensibilização que integram a hipernocicepção, aparecem em tempos anteriores ao aparecimento dos sintomas da EAE, podendo ser considerados fenômenos “marcadores” da mesma.

Numerosos trabalhos da literatura têm demonstrado a importância de compostos derivados de venenos ou toxinas animais no tratamento de uma grande variedade de doenças humanas. Nesse sentido, estudos realizados utilizando a crotoxina, neurotoxina isolada do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* demonstraram seu efeito analgésico, antiinflamatório e imunomodulatório em diferentes modelos experimentais. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da crotoxina, tanto na dor quanto na instalação e evolução do quadro clínico da Encefalomielite Autoimune Experimental, modelo animal da esclerose múltipla. Nossos resultados demonstram que a hiperalgesia neste modelo, surge antes dos primeiros sinais clínicos, corroborando com os dados da literatura. A administração de crotoxina, em dose única e não tóxica, acarreta potente e duradouro efeito antinociceptivo. Ainda, quando administrada em doses repetidas, esta toxina, além de interferir com o fenômeno de hipernocicepção, interfere com o desenvolvimento e a intensidade da doença, observados por um retardo no início do aparecimento dos sinais clínicos bem como por uma menor intensidade nestes sinais. Com relação à mediação química, observamos que o efeito antinociceptivo da crotoxina envolve a participação de receptores peptídeo formil, por ação da lipoxina A₄, e ainda, a participação dos receptores muscarínicos. Uma vez que a esclerose múltipla não tem cura, os resultados obtidos até o momento ressaltam a importância deste estudo, bem como confirmam os possíveis efeitos terapêuticos observados anteriormente para a crotoxina.

Palavras-chave: Analgesia; *Crotalus*; Crotoxina; Dor; Encefalomielite Autoimune Experimental.

ABSTRACT

Teixeira, Nathália Bernardes. Evaluation of crotoxin effect in the experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. 2012. 81 p. Dissertation (Toxicology). Instituto Butantan, Sao Paulo, 2012.

Multiple sclerosis is a Central Nervous System inflammatory demyelinating disease that has as primary symptoms losses of sensory, cognitive and motor functions. Among the sensory alterations, pain is one of the major concern, affecting various aspects of the patients lives. It is important to point out that MS has no cure, being the therapeutic approaches focused on stopping disease progression and cumulative neurological disability, promoting the relief of symptoms, improving the quality of life. Despite the importance of pain in multiple sclerosis, few experimental studies have been conducted in order to characterize the mechanisms involved in its genesis since locomotor impairments that accompany the disease difficult the response of the animals in experimental models of pain evaluation.

Several animal models of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) have been developed, trying to reproduce, in animals, anatomical and behavioral changes observed in human multiple sclerosis. Recently, it was demonstrated that in MOG₃₅₋₅₅-induced EAE, an animal model of multiple sclerosis, hyperalgesia and allodynia, two phenomena of sensitization, appear before the onset of EAE symptoms, been considered "markers" of the same.

Numerous studies in the literature have demonstrated the importance of compounds derived from animal poisons or toxins to treat a variety of human diseases. In this meaning, studies using crotoxin, a neurotoxin isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, demonstrated that this toxin is able to induce analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory effects in different experimental models. Based on these information, the aim of this study is to evaluate the effect of crotoxin in the pain and in the onset and progression of clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. Our results demonstrated that MOG₃₅₋₅₅-induced hyperalgesia arises before the onset of clinical signs, confirming previous data from Literature. Crotoxin, administered in a single dose, induced potent and long-lasting antinociceptive effect. When administered in repeated doses, besides interfering with the phenomenon of hypernociception, crotoxin interferes with the development and severity of the disease, observed by a delay in the onset of clinical signs as well as a lower intensity of these signs. In relation to the chemical mediation, the antinociceptive effect of crotoxin involves the participation of formyl peptide receptors, through the release of lipoxin A4, and the participation of muscarinic receptors. Since multiple sclerosis has no cure, results herein obtained confirm the importance of this study as well as the possible therapeutic effects of crotoxin previously observed.

Keywords: Analgesia; *Crotalus*; Crotoxin; Pain; Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama esquemático mostrando as etapas patogênicas e fatores que contribuem para os danos nos tecidos na EM.....	24
Figura 2: Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	29
Figura 3: <i>von Frey</i> eletrônico.....	37
Figura 4: Aparelho do Rota Rod.....	38
Figura 5: Avaliação das alterações na sensibilidade dolorosa de animais imunizados com MOG ₃₅₋₅₅	41
Figura 6: Avaliação dos sinais clínicos dos animais imunizados com MOG ₃₅₋₅₅	42
Figura 7: Avaliação das atividades motoras dos animais.....	45
Figura 8: Avaliação do efeito da crotoxina (única dose) na hipernocicepção de animais portadores de EAE.....	46
Figura 9: Avaliação do efeito da crotoxina (dose única) nos sinais clínicos de animais portadores de EAE.....	47
Figura 10: Avaliação do efeito da crotoxina (5 doses seguidas) na hipernocicepção de animais portadores de EAE.....	50
Figura 11: Avaliação do efeito da crotoxina (5 doses seguidas) nos sinais clínicos de animais portadores de EAE.....	51
Figura 12: Incidência de EAE em animais imunizados com MOG e tratados com crotoxina.....	52
Figura 13: Avaliação das atividades motoras dos animais.....	53
Figura 14: Avaliação do efeito da crotoxina (5 doses de 40 µg/kg, uma dose a cada 3 dias) na hipernocicepção de animais portadores de EAE.....	55
Figura 15: Avaliação do efeito da crotoxina (5 doses de 40 µg/kg, uma dose a cada 3 dias) nos sinais clínicos de animais portadores de EAE.....	56
Figura 16: Avaliação da participação de receptores peptídeo formil no efeito antinociceptivo da CTX (5 doses seguidas).....	58

Figura 17: Avaliação da participação de receptores paptídeo formil no efeito antinociceptivo da CTX (doses intercaladas).....**60**

Figura 18: Avaliação da participação da Lipoxina A4 no efeito antinociceptivo da CTX (doses repetidas).....**62**

Figura 19: Avaliação da participação de receptores muscarínicos no efeito antinociceptivo da CTX (doses repetidas).....**64**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
APC	Célula apresentadora de Antígeno
Boc	<i>Butoxycarbonyl</i>
CA	Componente A- Crotapotina
CB	Componente B- Fosfolipase A2
Célula NK	Célula <i>natural killer</i>
Célula Treg	Célula T regulatória
Células Th	Células T helper
CEUAIB	Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
CFA	Adjuvante Completo de Freund
ChAT	colina-acetiltransferase
cm	centímetro
CSF	Fluído Cérebro-Espinhal
CTX	Crotoxina
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EM	Esclerose Múltipla
FLA ₂	Fosfolipase A ₂
FPLC	<i>Fast-performance liquid chromatography</i>
g	grama
HCl	Ácido clorídrico
i.p.	intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Proteína induzida por Interferon-γ
kDa	<i>kilodalton</i>
kg	quilograma
LFA-1	Antígeno associado à função linfocitária 1
LT	Linfotoxina
MAC	Complexo de Ataque de Membrana

MAG	Glicoproteína associada à Mielina
MBP	Proteína Básica de Mielina
MF	Medida final
MI	Medida inicial
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MOG	Glicoproteína de Mielina de Oligodendrócito
NaCl	Cloreto de sódio
NDGA	<i>Nordihydroguaiaretic acid</i>
ng	nanograma
nm	nonomolar
OCB	Bandas Oligoclonais
PBS	Tampão Fosfato Salino
PLP	Proteína proteolipídica
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
rpm	Rotação por minuto
s.c.	subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
Δ	delta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Esclerose Múltipla	17
1.1.1. Tratamentos para esclerose múltipla.....	25
1.1.2. Dor em pacientes com Esclerose Múltipla.....	25
1.2. Modelos experimentais para o estudo de esclerose múltipla - Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)	26
1.2.1. Alterações da sensibilidade dolorosa em animais portadores de EAE.....	27
1.3. Crotoxina e seus possíveis efeitos terapêuticos	28
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. animais	35
3.2. Indução da EAE	35
3.3. Delineamento Experimental	35
3.4. Avaliação da sensibilidade dolorosa: Determinação da hiperalgesia mecânica pelo <i>von Frey</i> Eletrônico	36
3.5. Avaliação da atividade motora pelo teste do Rota Rod	37
3.6. Tratamentos farmacológicos	38
3.7. Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Implementação do modelo de EAE	40
4.1.1. Avaliação das alterações de sensibilidade dolorosa em animais portadores de EAE.....	40
4.1.2. Avaliação dos sinais clínicos em animais portadores de EAE.....	40
4.1.3. Avaliação das alterações motoras nos animais portadores de EAE.....	43
4.2. Avaliação do efeito da crotoxina sobre o desenvolvimento de EAE	43
4.2.1. Tratamento agudo.....	43
4.2.2 Tratamento repetido.....	48
4.2.2.1. Tratamento diário.....	48
4.2.2.2. Tratamento com intervalo de 3 dias entre as doses.....	54
4.3. Mediação química do efeito antinociceptivo da crotoxina	57

4.3.1. Participação dos receptores peptídeo formil no efeito antinociceptivo da CTX.....	57
4.3.2. Participação da Lipoxina A4 no efeito antinociceptivo da CTX.....	61
4.3.3. Participação dos Receptores Muscarínicos no efeito antinociceptivo da CTX.....	63
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÃO.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC), que afeta mais de 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo. É uma desordem de origem autoimune, onde o sistema imunológico reconhece como antígenos, componentes do SNC, mais especificamente, peptídeos que constituem a bainha de mielina dos axônios de neurônios (Sloane, Ledebor et al. 2009; Miller and Rhoades 2012). Podem ser observadas diversas alterações motoras, cognitivas e sensoriais, que acarretam perdas sensoriais, problemas visuais, fraqueza muscular, ataxia, fadiga, alterações funcionais da bexiga e funções intestinais, perda de memória, dificuldades de coordenação e de fala, entre outros (Aicher, Silverman et al. 2004; Slavin, Kelly-Modis et al. 2010).

Patologicamente a EM é caracterizada por placas de desmielinização na substância branca do SNC, acompanhado por infiltrados perivasculares de células T, B e macrófagos. Recentemente, as diversas lesões observadas em pacientes com EM foram classificadas em quatro subtipos (Lucchinetti, Bruck et al. 2000). Os tipos de lesão foram categorizados pelas diferenças na viabilidade e mecanismos de morte dos oligodendrócitos (apoptose ou necrose), a definição dos limites da lesão e a localização das lesões em relação às veias. Os quatro subtipos são: **Subtipo 1**. Este subtipo possui a presença predominante de células T, macrófagos e substâncias efetoras, como por exemplo, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ); **Subtipo 2**. Neste subtipo predominam a deposição de anticorpos específicos para glicoproteína de mielina de oligodendrócito (MOG) e proteína básica de mielina (MBP), os quais estão envolvidos nos mecanismos de ação de destruição dos tecidos; **Subtipo 3**. Lesões com perda preferencial da glicoproteína associada à mielina (MAG) e oligodendrogliopatia. Além disso, a vulnerabilidade dos oligodendrócitos pode aumentar a resposta imunológica; **Subtipo 4**. A degeneração de oligodendrócitos não apoptóticos é marcante. As lesões dos quatro subtipos contém linfócitos inflamatórios e células mielóides, no entanto, lesões do subtipo 2 distingue-se exclusivamente pela presença de depósitos de Imunoglobulina G (IgG), bem como o complemento ativado, o que

sugere um papel para os anticorpos no desenvolvimento dessas lesões (Lucchinetti, Bruck et al. 2000). Além das características da lesão descrita acima, proliferação de astrócitos e danos axonais são observados em alguns pacientes (Lassmann, Raine et al. 1998). O reconhecimento dos diferentes tipos dessa doença conduziu à visão de que a patogênese da EM não decorre de uma única via, envolvendo uma sequência de eventos comuns a todos os pacientes. Ao invés disso, múltiplas vias de sinalização que diferem nos disparadores específicos dessa doença, nos mecanismos de tolerância imunológica e no tipo de células efetoras que causam a doença podem levar a EM (Lassmann, Raine et al. 1998; Lucchinetti, Bruck et al. 2000; Hemmer, Cepok et al. 2002). Embora estas questões sejam difíceis de estudar em seres humanos, modelos animais para EM têm fornecido algumas respostas sobre os mecanismos que regulam as ações de diferentes células do sistema imunológico capazes de mediar doenças autoimunes no SNC (Seamons, Perchellet et al. 2003).

O primeiro evento importante na patogenia desta doença é a ruptura da barreira hematoencefálica. Esta ruptura é decorrente de uma reação neuroinflamatória, onde citocinas pró-inflamatórias rompem as junções proteicas das células endoteliais do sistema nervoso central, permitindo o influxo de células inflamatórias tanto na medula espinal como em regiões supraespinais do SNC. Essas alterações resultam em auto-agressão ao SNC, mediada principalmente por linfócitos T, além de marcante ativação de células da glia (microglia e astrócitos) (Martin, McFarland et al. 1992; Petzold, Eikelenboom et al. 2002; Jadidi-Niaragh and Mirshafiey 2011). Esta resposta inflamatória é mediada principalmente por células T helper (Th), sendo que as diferentes formas clínicas da EM decorrem do envolvimento de diferentes populações de células Th, suas proporções no sítio inflamatório e a citocina predominante por elas geradas [interleucina (IL)-17, produzida por células Th17 ou IFN- γ , produzida por células Th1] (Martin, McFarland et al. 1992; El-behi, Rostami et al. 2010). As células Th1 e Th17 têm papel importante no desenvolvimento da EM e contrasta com visões anteriores, onde afirmava-se que a EM era mediada somente pela Th1 (Pittock and Lucchinetti 2007).

Com relação às células Th17, a principal função das citocinas produzidas por estas células é a indução de reações inflamatórias. Por este motivo, elas são consideradas como potentes células lesivas em reações neuroinflamatórias no SNC

(Hofstetter, Ibrahim et al. 2005; Iwakura and Ishigame 2006). Como citado anteriormente, a IL-17 é uma das principais citocinas produzidas por estas células. A IL-17 é um potente indutor de infiltrado de neutrófilos e citocinas inflamatórias (Ivanov, McKenzie et al. 2006; Jadidi-Niaragh and Mirshafiey 2011), e sua detecção em altos níveis em pacientes com EM indica a sua importância na patogênese da EM (Matusevicius, Kivisäkk et al. 1999; Lock, Hermans et al. 2002). Foi observado, ainda, que a alta expressão de IL-17 está correlacionada com a gravidade da EM (Matusevicius, Kivisäkk et al. 1999). Entre outras citocinas pró-inflamatórias produzidas por células Th17, que são importantes para a patologia da EM, estão incluídas a IL-6, IL-21, IL-22, IL-23 e TNF- α (Sloane, Ledebor et al. 2009; El-behi, Rostami et al. 2010; Slavin, Kelly-Modis et al. 2010; Jadidi-Niaragh and Mirshafiey 2011).

A característica mais marcante na inflamação do SNC, mediada por células Th1, é o infiltrado de macrófagos. Como mencionado anteriormente, as células Th1 também produzem citocinas importantes na patogênese da EM, entre elas o IFN- γ , que tem papel relevante na promoção da inflamação na medula espinal (El-behi, Rostami et al. 2010). Além do seu efeito inflamatório, o IFN- γ é capaz de regular a diferenciação e/ou proliferação de células T. Neste sentido, o IFN- γ induz a diferenciação de Th1 e, ainda, inibe o desenvolvimento de Th17, uma vez que a presença de IFN- γ pode impedir que a IL-12 promova a expansão das células Th17 (Harrington, Hatton et al. 2005). Além disso, IFN- γ aumenta a expressão de T-bet (fator de transcrição específico e essencial para a expressão de IFN- γ e do fenótipo Th1), sendo que essa superexpressão de T bet leva a uma robusta redução na produção de IL-17 (Harrington, Hatton et al. 2005). Estes são alguns dos fatores que contribuem para as diferentes formas clínicas da EM em decorrência das diferentes populações de células Th presentes.

Outro subtipo de célula T importante na EM é a célula T regulatória (Tregs). Estas células têm grande importância não só na EM como também em outros tipos de doenças autoimunes, uma vez que são capazes de controlar a doença e prevenir sua progressão. Apesar destas células não terem sua proliferação alterada na EM, suas funções estão diminuídas, levando ao comprometimento na sua capacidade de controlar a progressão da doença (Huan, Culbertson et al. 2005). Nesse sentido, ressaltamos a importância da IL-2, um fator de crescimento celular crítico para o

desenvolvimento destas células. Ainda, a IL-2 acarreta a expansão de subpopulações de células NK (*natural killer*), células que possuem funções inibitórias em respostas inflamatórias autoimunes, e é capaz ainda de inibir o desenvolvimento de células Th17 (Hao, Campagnolo et al. 2011; Jadidi-Niaragh and Mirshafiey 2011). Foi demonstrado que durante a EM as células NK estão significativamente reduzidas (Munschauer, Hartrich et al. 1995).

Apesar dos marcantes avanços no entendimento da patogenia da EM, os detalhes dos mediadores inflamatórios envolvidos e sua sequência de liberação ainda são desconhecidos. Foi demonstrado que a degeneração axonal é a principal responsável pelas alterações neurológicas irreversíveis em pacientes com EM. Esta lesão é observada no início da doença e está correlacionada com a intensidade da resposta inflamatória (Bjartmar, Wujek et al. 2003). Ensaio experimental demonstram que a administração de IL-2, tanto em pacientes portadores de esclerose múltipla quanto em modelo experimental de EAE remitente, acarreta tanto a recuperação quanto a expansão de células NK. Nestes animais, esta terapia acarreta, ainda, retardo no início da doença, maior intervalo entre os períodos de remissão da doença e diminuição da sua severidade (Hao, Campagnolo et al. 2011).

Foi observado que as Igs estão elevadas no fluído cérebro-espinal (CSF) de pacientes com EM (Kabat, Baer et al. 1950) e este fato tem sido a prova mais importante e mais antiga do envolvimento de células B e anticorpos na patogenia da EM. A correlação entre o aumento de Ig no CSF, com episódios de agravamento, e a ausência de bandas oligoclonais (OCB) em alguns pacientes com EM, sugere o envolvimento da resposta humoral nesta doença (Sospedra and Martin 2005). As células B não atravessam a barreira hematoencefálica intacta, no entanto, uma vez que a inflamação foi iniciada, as células B, anticorpos e componentes do sistema complemento podem entrar no SNC. A observação do aumento de Igs no CSF de pacientes com EM (Kabat, Baer et al. 1950), mas não no soro, indica uma produção local de imunoglobulinas. A ativação de células B pode ocorrer devido à estimulação por antígenos de proteínas próprias ou não, através de um efeito aleatório durante a inflamação em lesões de EM, ou pela estimulação de superantígenos. As células B e os anticorpos podem contribuir para a patogênese da EM de várias formas: (a) as células B podem agir como células apresentadoras de antígenos (APCs), sinalizando para as células T auto-reativas. O apoio a este mecanismo é que a

especificidade dos epítomos dos anticorpos gerados durante a Encefalomielite Autoimune Experimental, os epítomos de células T encefalogênicas e os epítomos de células B e T imunodominantes em seres humanos muitas vezes se sobrepõe; (b) as células B podem proporcionar a co-estimulação de células T auto-reativas; (c) as células B e Igs ligados a tecidos inflamados podem recrutar células T auto-reativas para o SNC (Lou, Park et al. 2000); (d) Idiotope (uma parte do sítio de ligação do antígeno) específico de células T pode ser ativado por Igs do CSF, sendo que estas células T sustentam as células B que produzem tais idiotopes (Holmoy, Vandvik et al. 2003); (e) a produção de anticorpos específicos de mielina e a destruição da mielina no interior das placas, parece ser a forma mais importante de contribuição das células B para a patogênese da EM (Sospedra and Martin 2005).

Em 1959, pesquisadores demonstraram que fatores humorais teriam importante papel na desmielinização inflamatória. Esse fato foi demonstrado em ensaio *in vitro* de atividade desmielinizante induzida por um fator presente no soro, mais tarde identificado como uma Ig específica de mielina (Bornstein and Appel 1959). Mais evidências surgiram de estudos histopatológicos de tecidos do SNC e da análise do CSF. As células B, células plasmáticas e anticorpos específicos de mielina foram detectados em placas de EM e em áreas de desmielinização ativa em pacientes com EM (Esiri 1977; Mattson, Roos et al. 1980; Genain, Cannella et al. 1999). Os anticorpos podem causar desmielinização por diferentes maneiras, entre elas, por opsonização da mielina para a fagocitose (Trotter, DeJong et al. 1986; Goldenberg, Kwon et al. 1989; van der Laan, SR et al. 1996), por ativação do complemento, levando a deposição do complexo de ataque de membrana (MAC) ou ainda por citólise mediada pelo complemento (Mead, Singhrao et al. 2002).

A Figura 1 resume os acontecimentos mais importantes na EM. As células T CD4⁺ auto-reativas são ativadas na periferia por reconhecimento, por exemplo, de um peptídeo viral ou de algum outro sinal não definido, ou ainda por coestimulação por diferentes fatores associados. Alguns fatores que contribuem para um ambiente pró-inflamatório incluem citocinas derivadas de células T e APCs (por exemplo, IL-12, IFN- γ), a força de ativação e do contexto infeccioso. As células T ativadas aderem ao endotélio da barreira hematoencefálica através de moléculas de adesão (LFA-1 e VLA-4), e transmigram para o parênquima cerebral por meio de células endoteliais vasculares cerebrais. Cabe ressaltar que diversos mecanismos ainda são

pouco claros, incluindo: o que orienta as células T CD4⁺ para o SNC; se a apresentação do antígeno nos nódulos linfáticos cervicais profundos é necessária; e se existe um gradiente de quimiocinas de dentro do parênquima cerebral para o sangue durante os eventos iniciais. No entanto, experimentos com EAE mostraram que células T encefalitogênicas são transitóriamente encontradas nos nódulos linfáticos cervicais profundos, e em seguida, reativadas localmente no SNC (Flügel, Berkowicz et al. 2001). Posteriormente, citocinas pró-inflamatórias [IFN- γ , IL-23, TNF- α , linfotóxina (LT)] e quimiocinas (RANTES, IP-10, IL-8, entre outros) (a) ativam células residentes, como microglias e astrócitos; (b) recrutam outras células imunes, incluindo monócitos, células T CD8⁺, células B e mastócitos, a partir do sangue periférico e, (c) orquestram a formação da lesão inflamatória. A formação da lesão inflamatória é caracterizada por abertura na barreira hematoencefálica com edema no tecido após a liberação de mediadores e proteases dos mastócitos, monócitos e células T, bem como, por uma série de moléculas pró-inflamatórias, radicais de oxigênio e nitrogênio. Danos em tecidos do SNC, ou seja, da bainha de mielina, de oligodendrócitos e de axônios, ocorrem nessa fase inicial da inflamação. Durante as etapas acima, as células T CD4⁺ auto-reativas dirigem esse processo, enquanto que seu papel na fase efetora é provavelmente secundário. Numerosos processos podem levar a danos na mielina, em oligodendrócitos e nos axônios, incluindo: a presença de radicais livres, de TNF- α e de LT; - a deposição direta do complemento ou a ativação do complemento mediada por anticorpos; - a via de receptores Fc citotóxico celular dependente de anticorpos; - fagocitose de mielina; - lise direta dos axônios por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos; - secreção de proteases; e - apoptose dos oligodendrócitos. Além disso, o aumento da produção e diminuição da degradação ou recaptção de neurotransmissores excitatórios e de glutamato, pelos astrócitos, leva à excitotoxicidade dos oligodendrócitos mediada por glutamato, através do influxo de cálcio mediado por receptores deste neurotransmissor (Pitt, Werner et al. 2000). O evento inflamatório dura até duas semanas; como resultados são observados axônios desmielinizados, oligodendrócitos e células T apoptóticas e transecções axonais com saliências no bulbo, devido à interrupção do transporte axonal (Trapp, Peterson et al. 1998). A partir daí, macrófagos carregam lipídios de mielina fagocitada, iniciando a proliferação dos astrócitos. Apesar da limpeza dos detritos, para início da resolução da lesão, ainda existe uma dominância relativa de citocinas

de células Th2/Th3, tais como IL-10 e fator de transformação do crescimento (TGF)- β , e a secreção de vários fatores de crescimento (fatores neurotróficos derivados do cérebro, fatores de crescimento derivados de plaquetas, fatores neurotróficos ciliares, e fatores de crescimento dos fibroblastos), tanto por células residentes quanto por células T. Precusores de oligodendrócitos que ainda estão presentes no SNC também são ativados, e os oligodendrócitos sobreviventes começam a remielinizar as áreas afetadas entre os nós, porém a espessura da mielina não é igual a original e a velocidade de condução nervosa é mais lenta nessas regiões reparadas, apesar da redistribuição compensatória dos canais de sódio.

incidência em mulheres do que em homens, sendo que diversos fatores tem sido sugeridos para explicar esta diferença, entre eles, os hormônios sexuais femininos, a genética e o ambiente (Eikelenboom, Killestein et al. 2009; Tintoré and Arrambide 2009).

1.1.1. Tratamentos para esclerose múltipla

A EM não tem cura, sendo que a terapêutica se concentra nas ações que atrasam a progressão da doença e melhoram a qualidade de vida do paciente pela promoção do alívio dos sintomas.

Atualmente são utilizados diversos medicamentos para o tratamento da EM. Para reduzir a espasticidade podem ser utilizados paracetamol, baclofeno, diazepam (O'Connor, Schwid et al. 2008) e canabinóides (Leussink, Hussein et al. 2012). Para o tratamento da dor crônica podem ser utilizados antidepressivos e anticonvulsivantes (Finnerup, Gottrup et al. 2002; Dworkin, Backonja et al. 2003; Finnerup, Otto et al. 2005; Attal, Cruccu et al. 2006), e também analgésicos opióides, tramadol e inibidores de captação de serotonina e norepinefrina (Dworkin, Backonja et al. 2003; Finnerup, Otto et al. 2005). Para as disfunções urinárias geralmente são utilizadas drogas anticolinérgicas, desmopressina, agentes vanilóides, canabinóides e toxina botulínica (Tubaro, Puccini et al. 2012). Ainda, são utilizados imunomoduladores como o acetato de glatirâmer e o interferon β (Croze, Yamaguchi et al. 2012; Gasperini and Ruggieri 2012; Meuth, Gobel et al. 2012) e corticosteroides (Nicholas and Rashid 2012). Thibault e cols (Thibault, Calvino et al. 2011) avaliaram experimentalmente, em animais, algumas drogas que geralmente são utilizadas no tratamento da esclerose múltipla. Estes autores observaram que o tratamento de animais portadores de EAE após o surgimento dos sinais clínicos, com acetaminofeno, gabapentina, tramadol e duloxetina não interfere com o curso da doença em nenhum dos animais testados.

1.1.2. Dor em pacientes com Esclerose Múltipla

Dentre as alterações sensitivas, a dor é um dos graves problemas que afetam pessoas portadoras de esclerose múltipla. Estima-se que entre 44 e 80% das

peças que sofrem de esclerose múltipla, apresentam dor em alguma fase da doença (Ehde, Osborne et al. 2006; Osborne, Jensen et al. 2007; Hirsh, Turner et al. 2009; Sloane, Ledebøer et al. 2009; Nick, Roberts et al. 2012). A dor da esclerose múltipla pode ser de origem neuropática ou músculo-esquelética, aguda ou crônica. Na maioria dos casos, o indivíduo apresenta dor crônica, severa e difusa, interferindo com diversos aspectos da sua vida, entre eles o sono, a recreação e atividades ocupacionais, sendo que nesta fase os pacientes apresentam, ainda, graves sintomas de depressão (Ehde, Osborne et al. 2006; Osborne, Jensen et al. 2007; Hirsh, Turner et al. 2009; Sloane, Ledebøer et al. 2009; Nick, Roberts et al. 2012). A dor da EM pode ser originária de diferentes fatores, entre eles, a inflamação característica desta doença, dor neuropática resultante da lesão do sistema nervoso central, parestesia resultante da lesão de neurônios do gânglio dorsal da medula espinal, neuralgia decorrente de lesão no trigêmeo, dor secundária resultante de espasmos e contrações musculares decorrentes de desmielinização do tronco cerebral ou da medula espinal e hipertonicidade muscular secundária às lesões dos tratos corticoespinal, corticobulbar ou bulboespinal. Ainda, podem ser observadas dores de origem músculo-esquelética resultantes de anormalidade postural e enxaquecas (Ehde, Osborne et al. 2005; Osborne, Jensen et al. 2007; Nick, Roberts et al. 2012).

1.2. Modelos experimentais para o estudo de esclerose múltipla - Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

Diversos modelos animais de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) têm sido desenvolvidos para tentar reproduzir, em animais, as alterações anatômicas e comportamentais observadas na esclerose múltipla em humanos. Estes modelos têm sido utilizados para estudar tanto o desenvolvimento e progressão da doença, quanto para ensaios pré-clínicos para avaliação de novas drogas com potencial terapêutico (Sloane, Ledebøer et al. 2009). Estes modelos reproduzem a inflamação no SNC, a desmielinização dos neurônios e as alterações motoras observadas na esclerose múltipla (Baxter 2007; Basso, Frenkel et al. 2008; Olechowski, Parmar et al. 2009). A EAE pode ser induzida em camundongos geneticamente suscetíveis, pela imunização destes animais com uma emulsão

contendo antígenos relacionados à mielina. Para tanto, podem ser utilizados a proteína básica de mielina 84–104 (MBP_{84–104}), proteína proteolipídica 139–151 (PLP_{139–151}), ou glicoproteína de mielina de oligodendrócitos 35–55 (MOG_{35–55}). Dependendo da linhagem de camundongos e do antígeno utilizado, diferenças no curso de desenvolvimento da doença e nos sintomas apresentados podem ser encontradas (Basso, Frenkel et al. 2008; Olechowski, Parmar et al. 2009; Rodrigues, Sachs et al. 2009).

O MOG é uma glicoproteína transmembrânica que possui 218 amino-ácidos, pertencente à superfamília das Imunoglobulinas (Ig). É menos abundante do que as principais proteínas de mielina (0,01% - 0,05%), e não está localizado na mielina compacta, mas sim na superfície externa da membrana dos oligodendrócitos. Devido a esta localização “estratégica”, é diretamente acessível a anticorpos e acredita-se ser relevante como um alvo para as respostas imunes celular e humoral na EM. O MOG é expresso no final da mielinização e só é encontrado no cérebro, medula espinal e retina, não sendo encontrado em nervos periféricos (Sospedra and Martin 2005). A EAE induzida por MOG pode ser melhor examinada em camundongos C57BL/6, no qual o peptídeo MOG_{35–55} induz uma EAE crônica (Mendel, Kerlero de Rosbo et al. 1995; Sospedra and Martin 2005).

1.2.1. Alterações da sensibilidade dolorosa em animais portadores de EAE

Como citado anteriormente, dentre as alterações sensoriais, a dor é um dos graves problemas que afetam pessoas portadoras de esclerose múltipla. Apesar da sua importância, poucos estudos experimentais têm sido realizados com o intuito de caracterizar os mecanismos envolvidos na sua gênese e controle. Isto porque as alterações motoras que acompanham a doença dificultam e interferem nas respostas dos animais em modelos experimentais de avaliação da sensibilidade dolorosa.

Porém, recentemente, diferentes grupos de pesquisadores, utilizando modelo de EAE induzida pela imunização com o peptídeo MOG_{35–55}, demonstraram o aparecimento de hiperalgesia (Rodrigues, Sachs et al. 2009) e alodínia (Olechowski, Parmar et al. 2009; Lisi, Navarra et al. 2012; Yuan, Shi et al. 2012), dois fenômenos de sensibilização que integram a hipernocicepção, em tempos anteriores ao

aparecimento dos sintomas da doença, podendo ser considerados fenômenos “marcadores” da mesma. Rodrigues e cols (Rodrigues, Sachs et al. 2009) demonstraram, em modelo de hipernocicepção mecânica, que o fenômeno de hiperalgesia (definida como aumento da sensibilidade à dor) pode ser observado no 7º dia após imunização dos animais, enquanto os sinais clínicos que evidenciam a EAE apareceram apenas no 10º dia, com pico de déficit motor no 14º dia. Já os resultados de Olechowski e cols (Olechowski, Parmar et al. 2009) demonstraram que os primeiros sinais de alteração motora dos animais surgem entre o 13º e o 19º dias após imunização, enquanto que as alterações na sensibilidade dolorosa dos animais, pela detecção da alodínia (definida como dor em resposta a um estímulo não nocivo) táctil e ao frio, surgem entre o 5º e o 7º dias. Lisi e cols (Lisi, Navarra et al. 2012) avaliando alodínia mecânica, demonstraram que este fenômeno surge a partir do 4º dia após a imunização, sendo que os primeiros sinais clínicos começaram a aparecer somente a partir do 14º dia. Yuan e cols (Yuan, Shi et al. 2012) demonstraram que a alodínia surge a partir do 4º dia após a imunização e os sinais clínicos começam a aparecer somente a partir do 13º dia.

Assim, estes autores demonstraram que, neste modelo de EAE, as alterações de sensibilidade dolorosa surgem antes das primeiras evidências de sinais clínicos da doença, podendo ser estudada independentemente da presença das alterações motoras dos animais.

1.3. Crotoxina e seus possíveis efeitos terapêuticos

Numerosos trabalhos da literatura têm demonstrado a importância de compostos derivados de produtos naturais e/ou venenos animais no tratamento de uma grande variedade de patologias humanas. Isto se deve ao fato de milhões de anos de evolução terem conferido a estas substâncias duas características importantes para o desenvolvimento de um fármaco: especificidade e seletividade a seus alvos (Bailey and Wilce 2001; Lewis and Garcia 2003; Cury and Picolo 2006).

Nesse sentido, diversos estudos têm sido realizados, utilizando venenos ou toxinas animais, buscando identificar ações terapêuticas diversas nestes compostos. Particularmente em nosso laboratório, o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Figura 2) tem sido objeto de diversos estudos.



Figura 2: Serpente *Crotalus durissus terrificus* (Fonte: <http://cobrasserpentes.blogspot.com.br/2012/09/cascavel.html>)

O veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* é composto por uma mistura de peptídeos biologicamente ativos e proteínas com atividade enzimática (Brazil 1972). O diagnóstico clínico do envenenamento por estas serpentes baseia-se principalmente na observação de manifestações sistêmicas decorrentes da atividade neurotóxica do veneno. Os sintomas do envenenamento caracterizam-se pelo aparecimento da chamada face miastênica ou face neurotóxica, onde se observam ptose palpebral, diplopia, oftalmoplegia, flacidez na musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos. Além disso, são observados urina escurecida, refletindo a eliminação de mioglobina, com manifestação evidente de rabdomiólise, decorrente da atividade miotóxica do veneno (Rosenfeld 1971; Azevedo-Marques, P. et al. 1992). Apesar da presença de efeitos sistêmicos marcantes, não são observados, nestes envenenamentos, sinais inflamatórios significativos no local da picada (Brazil 1934; Amorin, R. et al. 1951). Nestes acidentes são relatados ausência de dor local ou dor local de pequena intensidade, seguida de parestesia, às vezes regional, com sensação de formigamento e adormecimento (Rosenfeld 1971; Azevedo-Marques, P. et al. 1992).

Dentre os diferentes compostos presentes neste veneno, a crotoxina é o principal componente tóxico responsável pela elevada toxicidade do veneno, contribuindo com cerca de 80% da letalidade do veneno bruto (Brazil 1934). Esta toxina foi isolada por Slotta e Fraenkel-Conrad, em 1938, e sua estrutura foi descrita por Fraenkel-Conrad e Singer, em 1956. A crotoxina é uma β -neurotoxina

heterodimérica, tendo como efeito principal o bloqueio da junção neuromuscular. Esta toxina é formada pela associação não-covalente de duas diferentes subunidades: a crotapotina (componente CA) e a fosfolipase A₂ (FLA₂ – componente CB). O peso molecular da crotoxina varia de 24 a 26 kDa, apresentando atividades fosfolipásica, neurotóxica e miotóxica (Brazil 1972; Gopalakrishnakone, Dempster et al. 1984).

A subunidade CB (FLA₂) tem cerca de 14 kDa, sendo constituída por uma cadeia polipeptídica única contendo 123 resíduos de aminoácidos, formando estruturas globulares associadas por sete pontes dissulfídicas (Aird, Yates et al. 1990). A subunidade CB confere atividade fosfolipásica ao veneno crotálico ou à fração crotoxina. A FLA₂ *per se* apresenta maior atividade enzimática que o complexo crotoxina, porém menor toxicidade, uma vez que são necessárias doses maiores desta fosfolipase, quando comparado ao veneno ou crotoxina, para a indução do bloqueio da transmissão neuromuscular (Choumet, Bouchier et al. 1996). Estudos têm demonstrado que a atividade enzimática desta FLA₂ é relevante para alguns de seus efeitos farmacológicos como letalidade, miotoxicidade e atividade coagulante. Ainda, diferentes regiões do sítio catalítico da FLA₂ estão envolvidos nos efeitos tóxicos e farmacológicos induzidos pela molécula (Soares, Mancin et al. 2001).

A subunidade crotapotina tem peso molecular de 8,9 kDa, e é desprovida de atividade enzimática e tóxica. Foi demonstrado, através de estudos de caracterização e sequenciamento, que esta subunidade é formada por três cadeias polipeptídicas, com 88 aminoácidos, unidas por sete pontes dissulfídicas (Aird, Yates et al. 1990). A função da crotapotina não está totalmente caracterizada, porém é aceito que esta molécula atue como carreadora da FLA₂, potencializando a atividade letal desta fosfolipase, ao mesmo tempo em que diminui sua atividade enzimática dentro do complexo crotoxina (Bon, Bouchier et al. 1989; Choumet, Bouchier et al. 1996). Estudos demonstraram que a crotoxina exerce seu efeito por meio da associação da fração FLA₂ aos seus alvos nas membranas plasmáticas nas terminações nervosas pré-sinápticas. Delot e Bon (1993) observaram que a subunidade crotapotina (CA) participa temporariamente da etapa na qual a fosfolipase A₂ (CB) se associa ao seu acceptor na membrana plasmática, formando um complexo ternário transitório. A subunidade CA se dissocia do complexo

crotoxina apenas após a ligação irreversível da FLA₂ ao seu receptor (Delot and Bon 1993).

Apesar do seu efeito tóxico, vários estudos experimentais e dados clínicos têm evidenciado que, adicionalmente às atividades neurotóxica e miotóxica, a crotoxina apresenta, em doses não-tóxicas, efeito imunomodulatório, antiinflamatório, antitumoral e analgésico (Cura, Blanzaco et al. 2002; Castro, Farias et al. 2007; Nogueira-Neto, Amorim et al. 2008; Nunes, Zychar et al. 2010; Sampaio, Hyslop et al. 2010).

Em relação aos efeitos sobre o sistema imune, Cardoso e Mota (Cardoso and Mota 1997) demonstraram que animais tratados com crotoxina e imunizados com albumina sérica humana ou ovoalbumina produzem menores níveis de anticorpo IgG1, quando comparado a animais controles. Resultados semelhantes foram obtidos por Zambelli e Cury (comunicação pessoal) em animais imunizados com albumina sérica bovina, demonstrando o efeito supressor da crotoxina sobre a resposta imunológica humoral. Ainda, a crotoxina acarreta inibição da proliferação de linfócitos em cultura (Garcia, Toyama et al. 2003) e de células esplênicas, induzida por concavalina A, sendo esta última atribuída a ambas subunidades da crotoxina (Cardoso, Lopes-Ferreira et al. 2001; Rangel-Santos, Lima et al. 2004).

Corroborando estes dados, Zambelli e Cury (comunicação pessoal) demonstraram que linfócitos isolados de linfonodos mesentéricos de ratos injetados com a subunidade CB apresentam uma baixa resposta proliferativa quando estimulados com concavalina A. Ainda, células esplênicas obtidas de animais tratados com crotoxina e estimulados com este mesmo agente liberam baixos níveis de IL-4 e IL-10 (Cardoso, Lopes-Ferreira et al. 2001; Rangel-Santos, Lima et al. 2004). Estes dados sugerem que as alterações na liberação de citocinas podem modular a ação da crotoxina na resposta imune humoral e na proliferação de linfócitos (Sampaio, Hyslop et al. 2010).

Ainda em relação ao efeito modulador da crotoxina sobre a funcionalidade de leucócitos, vários dados experimentais têm indicado que a crotoxina interfere com o número de leucócitos circulantes, além de aumentar os níveis séricos de citocinas (IL-6 e IL-10) e de glicocorticóides (Cardoso, Lopes-Ferreira et al. 2001). Zambelli e cols (Zambelli, Sampaio et al. 2008) demonstraram que a crotoxina, quando administrada em ratos, diminui o número de linfócitos tanto na circulação sanguínea

periférica quanto na linfa, além de favorecer a aderência de leucócitos às células endoteliais da microcirculação sanguínea e em vênulas do endotélio alto de linfonodos. Estas alterações parecem ser consequência, pelo menos em parte, de alterações na expressão de moléculas de adesão, uma vez que foi detectado aumento na expressão de LFA-1 em linfócitos obtidos de animais tratados com a toxina, sendo que estas alterações são moduladas, ainda, por mediadores lipídicos derivados da via da 5-lipoxigenase (Zambelli, Sampaio et al. 2008).

Com relação ao efeito antiinflamatório, foi demonstrado que a crotoxina acarreta efeito antiedematogênico de longa duração, avaliado no edema de pata induzido por carragenina em camundongos e mediado por receptores do tipo peptídeo formil (Nunes, Zychar et al. 2010). Ainda, sua subunidade crotapotina também é capaz de inibir edema de pata induzido por carragenina em ratos, através da interação com fosfolipases secretórias liberadas durante o processo inflamatório (Landucci, Antunes et al. 1995; Sampaio, Hyslop et al. 2010).

Adicionalmente aos dados “in vivo”, Sampaio e cols demonstraram que a crotoxina inibe as funções de espraiamento e fagocitose de macrófagos peritoneais (Sampaio, Brigatte et al. 2003). Estes autores demonstraram que macrófagos tratados com crotoxina apresentam polimerização anormal dos filamentos de actina e inibição da fosforilação e da ativação de proteínas das vias de sinalização intracelular, envolvidas com o processo de fagocitose (Sampaio, Santos et al. 2006), o que pode contribuir para as alterações induzidas pela toxina neste processo. Ainda, este efeito inibitório da toxina sobre os macrófagos é mediado por mediadores lipídicos derivados da via das lipoxigenases, (Sampaio, Santos et al. 2006; Zambelli, Sampaio et al. 2008) sendo que a crotoxina promove, ainda, aumento da secreção de lipoxina A₄, que tem sua ação mediada pelos receptores peptídeo formil, por estas células (Nunes, Zychar et al. 2010).

Além das ações antiinflamatória e imunomoduladora, foi também sugerida ação analgésica para a crotoxina (Zhang, Han et al. 2006; Zhu, Wu et al. 2008). Estudos têm mostrado que esta toxina é capaz de induzir antinocicepção em diferentes modelos experimentais de dor aguda e crônica. Zhang e cols mostraram em modelos experimentais de dor aguda, que a crotoxina induz antinocicepção, decorrente de ação central, sendo este efeito independente da participação de receptores muscarínicos ou opióides (Zhang, Han et al. 2006). Estudos realizados

em nosso laboratório mostraram que a crotoxina induz efeito antinociceptivo de longa duração em modelo de dor neuropática induzida pela transecção do nervo ciático de ratos, interferindo não só com o processo nociceptivo, mas também retardando a formação de neuromas. Neste modelo de dor crônica, o efeito da toxina é mediado pela ativação de receptores muscarínicos centrais e α -adrenoceptores (Nogueira-Neto, Amorim et al. 2008). Corroborando o efeito antinociceptivo, Brigatte e Cury (comunicação pessoal) evidenciaram que a crotoxina acarreta antinocicepção no modelo de tumor de pata de ratos induzido por carcinoma de Walker 256, inibindo ainda o próprio desenvolvimento do tumor, podendo ser esta inibição da massa tumoral um dos fatores responsáveis pelo efeito antinociceptivo.

Adicionalmente às evidências experimentais, ensaios clínicos de fase I mostraram que a crotoxina diminui a dor de pacientes portadores de neoplasias, bem como acarreta regressão do tumor destes pacientes (Cura, Blanzaco et al. 2002). É importante salientar que o efeito analgésico da crotoxina foi detectado mesmo nos pacientes que não apresentam regressão dos tumores.

Nesse sentido, a crotoxina tem sido a molécula líder nos estudos da empresa irlandesa Celtic Biotech Ltda, uma empresa biofarmacêutica que desenvolve novas terapias específicas para o tratamento de câncer e da dor. Estudos conduzidos por esta empresa têm demonstrado que a crotoxina induz analgesia mais potente que a morfina, quando comparada em base molar, sem acarretar dependência física (<http://www.celticbiotech.com>).

*

* *

Assim, baseado nos fatos de que a esclerose múltipla é uma doença inflamatória crônica de origem autoimune, sendo que um dos sintomas importantes é a ocorrência de dor intensa e que a crotoxina apresenta efeito imunomodulatório, antiinflamatório e analgésico, é nosso objetivo avaliar a ação da crotoxina tanto na dor quanto na instalação e evolução do quadro clínico da Encefalomielite Autoimune Experimental, modelo animal de esclerose múltipla.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da crotoxina tanto na dor quanto instalação e evolução do quadro clínico da Encefalomielite Autoimune Experimental induzida por MOG₃₅₋₅₅, modelo animal de esclerose múltipla, avaliando ainda as vias de mediação deste composto nesta doença. Assim os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Implementação do modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) em nosso laboratório;
- Avaliar o efeito da crotoxina na hiperalgesia mecânica induzida pela imunização dos animais com MOG₃₅₋₅₅;
- Avaliar se o tratamento com a crotoxina interfere com a instalação das alterações motoras e sinais clínicos causados pela Encefalomielite Autoimune Experimental;
- Avaliar a mediação química do efeito antinociceptivo da crotoxina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, mantidos com água e ração *ad libitum* em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo claro-escuro (12:12 h), em caixas de micro-ambiente por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o “Guia Ético para o Uso de Animais Conscientes em Ensaios de Dor”, publicado pela IASP (Zimmermann 1983) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, protocolo nº 757/10).

3.2. Indução da EAE

Para indução da EAE, os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.) com 200 µg de MOG₃₅₋₅₅ em CFA (adjuvante completo de Freund) contendo 5 mg/ml de *M. tuberculosis* (H37Ra, Difco) (Basso, Frenkel et al. 2008). Imediatamente após a imunização e 48 horas depois os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) contendo 200 ng de toxina de pertussis (Sigma-Aldrich). Animais controle foram tratados com o veículo (CFA, s.c. e PBS, i.p.). Os animais foram acompanhados diariamente quanto ao desenvolvimento da doença de acordo com os seguintes critérios: 0, ausência de sintomas; 1, perda do tônus da cauda; 2, paralisia parcial dos membros posteriores; 3, paralisia total de membros posteriores; 4, paralisia total dos membros posteriores e parcial dos anteriores; 5, diminuição da responsividade e morte (eutanásia). Animais que receberam grau 4 foram avaliados 2 vezes ao dia e foram eutanasiados na ocorrência de três graus 4 consecutivos.

3.3. Delineamento Experimental

Após um período de adaptação dos animais no laboratório, e de adaptação aos aparelhos utilizados neste projeto, os animais foram imunizados para indução da EAE como descrito no item 3.2. Após a imunização, os animais foram avaliados

diariamente quanto à sensibilidade dolorosa e à atividade motora, utilizando os modelos de *von Frey* eletrônico (item 3.4) e Rota Rod (item 3.5), respectivamente, a fim de se determinar o início das alterações de sensibilidade dolorosa e alterações motoras. Também foram avaliados diariamente quanto ao aparecimento dos sinais clínicos da EAE, de acordo com os critérios descritos no item 3.2. Determinados os períodos de instalação de cada um dos quadros (dor, alteração motora e sinais clínicos), os animais foram tratados com crotoxina (40 µg/kg). A escolha da dose da crotoxina se baseou em trabalhos demonstrando, que, nesta dose, a crotoxina acarreta efeito antiinflamatório sem induzir qualquer sinal de efeito tóxico (Nunes, Zychar et al. 2010). A crotoxina foi inicialmente administrada após o aparecimento das alterações na sensibilidade dolorosa, um indicativo do início da doença. Essa administração ocorreu em uma única dose ou em doses repetidas (5 doses). Neste segundo esquema, as 5 doses foram administradas em dias consecutivos ou com intervalo de 3 dias a cada dose. Determinada a capacidade da crotoxina em interferir com a dor e os sinais clínicos da EAE, investigamos a participação de alguns possíveis mediadores do efeito antinociceptivo da crotoxina. Para tanto, os animais foram tratados com Boc 2, um antagonista seletivo de receptor peptídeo formil. Após verificar que esses receptores estão envolvidos no efeito antinociceptivo da crotoxina, utilizamos o NDGA, um inibidor da via das lipoxigenases, para verificar a participação da Lipoxina A₄. Adicionalmente, realizamos ensaios para verificar a participação dos receptores muscarínicos utilizando o sulfato de atropina, um antagonista de receptores muscarínicos.

3.4. Avaliação da sensibilidade dolorosa: Determinação da hiperalgesia mecânica pelo *von Frey* Eletrônico

Para avaliação da sensibilidade dolorosa foi utilizado o *von Frey* eletrônico (Figura 3). Para a realização do teste, os animais foram colocados em caixas de acrílico, suspensas aproximadamente 30 cm da bancada, com fundo de arame, para permitir acesso às patas. Abaixo destas caixas foram colocados espelhos, que permitiram observar a pata do animal de qualquer ângulo. Os animais foram colocados nestas gaiolas 30 minutos antes do início do teste, para adaptação comportamental. Os testes foram realizados apenas quando os animais ficaram

quietos, sem movimentos exploratórios ou defecação e sem lamberem seus membros. Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica é mensurada através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas). A precisão do aparelho é de 0,1 g e o aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto, SP, BRA). Quando utilizado em camundongos, a força máxima aplicada é de 18 g. O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno de 0,5 mm². Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior dos animais e interrompida automaticamente quando os animais apresentaram uma resposta reflexa de retirada da pata. A estimulação da pata foi repetida até que os animais apresentassem duas medidas similares (Cunha, Verri et al. 2004). Os animais foram submetidos à análise da sensibilidade dolorosa antes (medida basal) e todos os dias após a imunização com MOG₃₅₋₅₅, até que aparecessem os primeiros sinais clínicos das alterações motoras. Os resultados foram expressos com Δ da resposta, onde o Δ corresponde a MI-MF.



Figura 3: *von Frey* eletrônico (Fonte: <http://www.dol.inf.br/Html/MetodosExperimentais.html>).

3.5. Avaliação da atividade motora pelo teste do Rota Rod

As alterações de habilidade e coordenação motoras foram avaliadas pelo rota-rod (Figura 4), utilizando-se metodologia descrita por Dunham e Miya (Dunham and Miya 1957). O aparelho de rota-rod consiste basicamente de um cilindro distante 7cm da superfície da mesa, que gira a velocidade constante de 18rpm. Para manter-

se sobre cilindro giratório, o animal necessita locomover-se, de modo que a capacidade locomotora pode ser então quantificada cronometrando-se o tempo de permanência do camundongo sobre o cilindro. O tempo é imediatamente interrompido quando o animal cai da barra giratória. O tempo de 120 s foi utilizado como tempo de corte. Os animais foram treinados no aparelho, diariamente, até que apresentassem tempo de permanência no aparelho semelhante em dias consecutivos. O teste foi empregado antes e diariamente após a indução da EAE. Os resultados foram avaliados através da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.



Figura 4: Aparelho do Rota Rod (Fonte: <http://tmc.sinica.edu.tw/rotarod.html>).

3.6. Tratamentos farmacológicos

Crotoxina – Purificada do veneno bruto de serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus*, segundo o método descrito por Faure e Bon (Faure and Bon 1987), modificado. A purificação foi realizada utilizando cromatografia de troca aniônica em uma coluna MONO-Q HR 5/5 de 5 ml, em sistema FPLC (fast-performance liquid chromatography, Pharmacia), em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,0. As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas por um gradiente linear de 0 a 1 M NaCl, tamponado com o tampão de equilíbrio, coletadas, e a eluição acompanhada pela

leitura da absorvância a 280 nm. As frações contendo a crotoxina foram testadas quanto à homogeneidade por eletroforese em gel de poliacrilamida e a atividade de fosfolipase A2, analisada em substrato cromogênico. Os tubos correspondentes a crotoxina foram reunidos e dialisados e a sua concentração determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976). A crotoxina foi administrada na dose de 40 µg/kg, uma dose sabidamente não tóxica (Nunes, Zychar et al. 2010), após o início da manifestação da dor. A crotoxina foi gentilmente cedida pela Dra. Sandra Coccuzo Sampaio Vessoni, do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

Boc 2 – Antagonista de receptor peptídeo formil, Boc 2 (butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe, Phoenix Pharmaceutical Inc, USA), na dose de 10 mg/200ml foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes do tratamento com crotoxina (Nunes, Zychar et al. 2010).

NDGA – Inibidor da via das lipoxigenases, na dose de 30 µg/kg foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes do tratamento com crotoxina (Nunes, Zychar et al. 2010).

Sulfato de atropina – Antagonista de receptores muscarínicos, na dose de 10 mg/kg foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes do tratamento com crotoxina (Nogueira-Neto, Amorim et al. 2008).

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de Análise de Variância (ANOVA Two-way) seguida de Tukey quando necessário (Snedecor and Haber 1946), utilizando o Programa GraphPad Prism 5. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Implementação do modelo de EAE

4.1.1 Avaliação das alterações de sensibilidade dolorosa em animais portadores de EAE

Para avaliação das alterações na sensibilidade dolorosa dos animais, foi utilizado o teste do *von Frey* eletrônico. Os animais foram tratados com a emulsão de MOG em CFA ou somente com CFA, no grupo controle. Durante a implementação do modelo de EAE os animais foram avaliados diariamente pelo teste de *von Frey* eletrônico e, baseado nesses resultados, foram escolhidos os tempos de avaliação dos demais ensaios. Os animais tratados com MOG apresentaram diminuição no seu limiar nociceptivo, traduzido pelo aumento na diferença entre as respostas inicial e final (Δ), caracterizando assim a instalação do fenômeno de hipernocicepção. Essa alteração teve início no 4º dia após a imunização, e se manteve até o 12º dia. No grupo controle, tratado com CFA, não houve alteração do limiar nociceptivo dos animais por todo período de avaliação (Figura 5). As medidas no *von Frey* eletrônico foram interrompidas após o 12º dia devido ao aparecimento dos sinais clínicos nos animais, que comprometia sua atividade motora, afetando assim a avaliação da sensibilidade dolorosa.

4.1.2 Avaliação dos sinais clínicos em animais portadores de EAE

Os primeiros sinais que indicam alteração do estado clínico dos animais, de acordo com os critérios estabelecidos no item 3.2, no grupo tratado com MOG, começaram a surgir a partir do 10º dia após a imunização. Essas alterações, traduzidas pelo déficit motor foram crescentes até o 24º dia, apresentando uma pequena diminuição na intensidade destes sinais a partir do 25º dia. No grupo controle, tratado apenas com CFA, não foi observada nenhuma alteração da atividade motora (Figura 6).

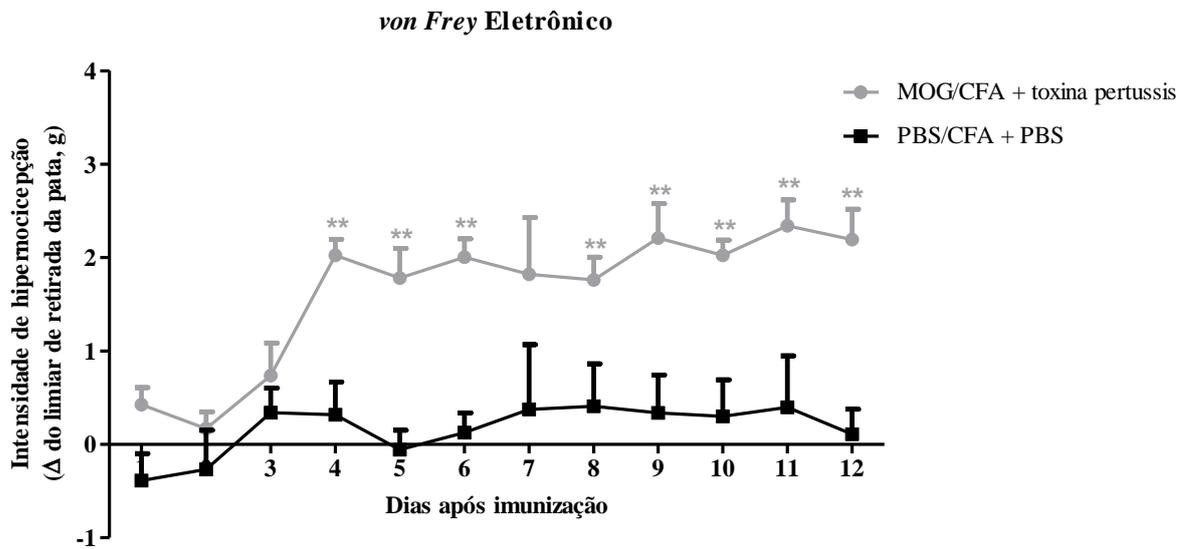


Figura 5: Avaliação das alterações na sensibilidade dolorosa de animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅. A sensibilidade dolorosa dos animais foi avaliada pelo modelo de *von Frey* eletrônico. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. O grupo controle recebeu CFA por via s.c. e PBS por via i.p. Os animais foram avaliados diariamente quanto à sensibilidade dolorosa. Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

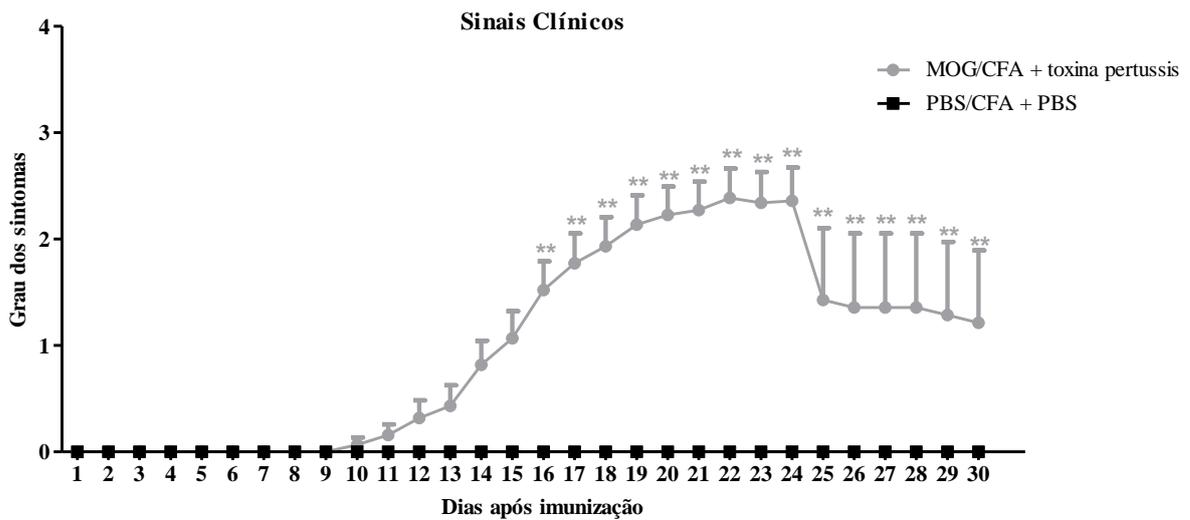


Figura 6: Avaliação dos sinais clínicos dos animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. O grupo controle recebeu CFA por via s.c. e PBS por via i.p. Os animais foram avaliados visualmente quanto ao aparecimento dos sinais clínicos, diariamente, utilizando-se a escala de parâmetros para estes sinais, descrita no item 3.2. De acordo com os sinais apresentados, os animais receberam grau de 0 à 5. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.1.3. Avaliação das alterações motoras nos animais portadores de EAE

Para determinar as alterações motoras dos animais foi utilizado o teste do Rota Rod. O tempo de permanência dos animais no aparelho foi registrado diariamente. Os animais tratados com MOG apresentaram diminuição no tempo de permanência no aparelho a partir do 12º dia, sendo esta alteração significativa a partir do 19º dia, período em que o comprometimento motor já está afetando as patas traseiras, e não mais apenas a cauda dos animais. Este déficit motor manteve-se durante todo o período de avaliação (até o 27º dia) (Figura 7).

4.2. Avaliação do efeito da crotoxina sobre o desenvolvimento de EAE

4.2.1. Tratamento agudo

Após a implementação do modelo de EAE, avaliamos o efeito da crotoxina (CTX). Os animais foram imunizados, e assim como na padronização, apresentaram hipernocicepção no 4º dia. No 5º dia após a imunização (1 dia após o início das alterações de sensibilidade dolorosa), os animais foram avaliados pelo teste de *von Frey* eletrônico e logo após tratados com uma única dose de CTX (40 µg/kg, via s.c.) ou salina. Os resultados demonstram que a administração de crotoxina foi capaz de reverter totalmente a hipernocicepção dos animais, quando comparado com o grupo controle (Figura 8A), sendo este efeito observado já na 1ª hora após a administração de crotoxina (Figura 8B). Este efeito antinociceptivo foi observado por até 5 dias após a administração da crotoxina, ou seja, até o 10º dia após a imunização, não sendo mais observado no 12º dia, sendo considerado assim um efeito de longa duração (Figura 8A). Os animais do grupo controle apresentaram o fenômeno de hipernocicepção por todo período de avaliação (até o 12º dia, quando foi interrompida a avaliação da sensibilidade dolorosa) (Figura 8A).

Os sinais clínicos foram avaliados diariamente após a imunização. As alterações clínicas dos animais tiveram início a partir do 11º dia após a imunização, tanto em animais tratados com crotoxina como em animais controle tratados com salina. A evolução dos sinais clínicos foi similar em ambos os grupos, demonstrando

que a administração de uma única dose de crotoxina não foi capaz de interferir com os sinais clínicos dos animais portadores de EAE (Figura 9).

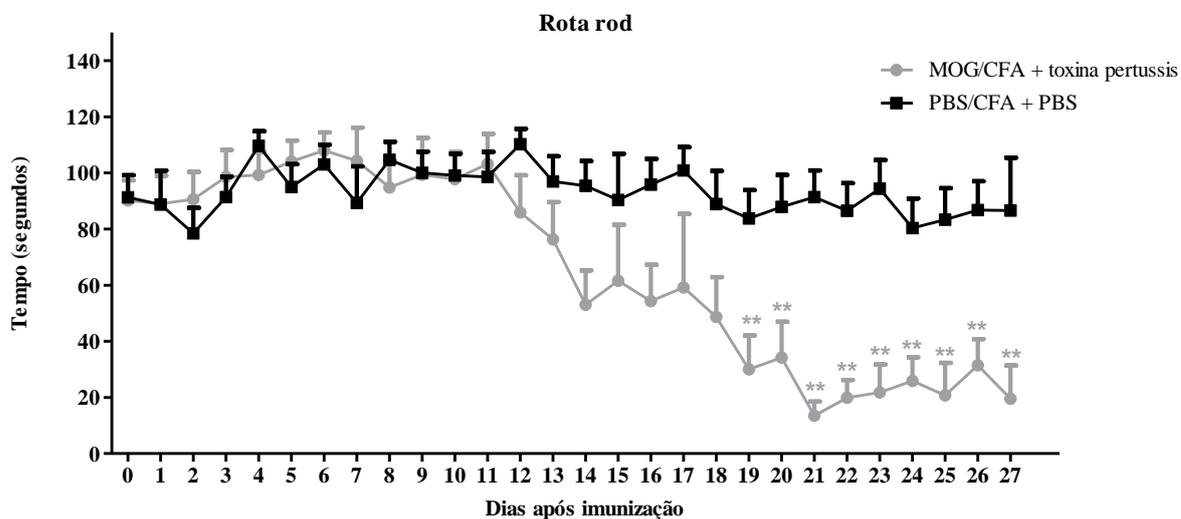


Figura 7: Avaliação das atividades motoras dos animais. As alterações motoras foram determinadas utilizando o teste do Rota Rod. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. O grupo controle recebeu CFA por via s.c. e PBS por via i.p. Os animais foram avaliados diariamente até o final do experimento. Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) p<0,05 em relação ao grupo controle.

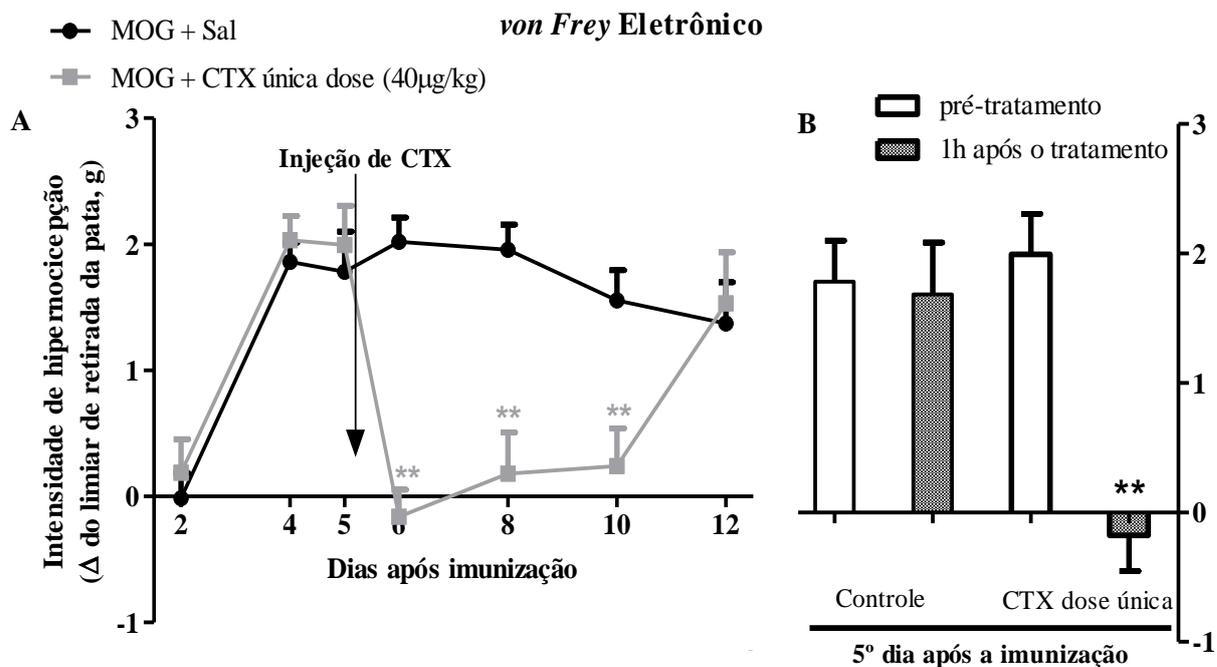


Figura 8: Avaliação do efeito da crotoxina (única dose) na hipernocicepção de animais portadores de EAE. As alterações de sensibilidade dolorosa foram avaliadas pelo teste de *von Frey* eletrônico. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. No 5º dia após a imunização os animais receberam crotoxina (40 µg/kg) por via s.c. ou salina (grupo controle) e foram avaliados até o 12º dia (Painel A). No 5º dia, os animais foram avaliados antes e 1 h após a administração de crotoxina (Painel B). Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) p<0,05 em relação ao grupo controle. (#) p<0,05 em relação à medida antes do tratamento.

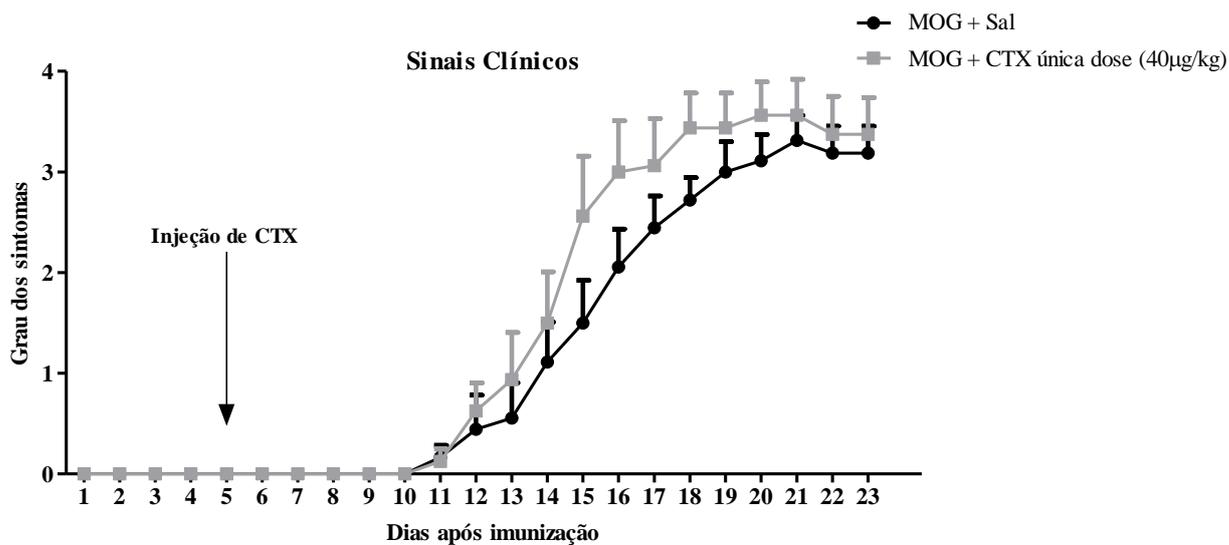


Figura 9: Avaliação do efeito da crotoxina (dose única) nos sinais clínicos de animais portadores de EAE. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. No 5º dia após a imunização os animais receberam crotoxina (40 µg/kg) por via s.c. ou salina (grupo controle). Os animais foram avaliados visualmente quanto ao aparecimento dos sinais clínicos, diariamente, utilizando-se a escala de parâmetros para estes sinais, descrita no item 3.2. De acordo com os sinais apresentados, os animais receberam grau de 0 à 5. Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos.

4.2.2 Tratamento repetido

4.2.2.1. Tratamento diário

Uma vez que o tratamento com uma única dose de crotoxina reverteu a hipernocicepção dos animais, porém não interferiu com a instalação dos sinais clínicos, e baseado em dados de nosso grupo demonstrando que, em modelos de dor crônica ou inflamação persistente, a crotoxina apresenta efeito somente após tratamento prolongado por 5 dias (Sampaio S.C., comunicação pessoal; Brigatte P., comunicação pessoal; Faiad 2008), utilizamos este protocolo nos próximos ensaios.

Para tanto, os animais foram imunizados e assim como nos outros experimentos apresentaram hipernocicepção a partir do 4º dia. No 5º dia os animais foram submetidos ao teste de *von Frey* e então divididos em dois grupos. O grupo experimental recebeu 5 injeções de CTX (40 µg/kg), a partir do 5º dia após a imunização (1 injeção/dia, no 5º, 6º, 7º, 8º e 9º dias após a imunização), enquanto que o grupo controle recebeu salina, nas mesmas condições experimentais. Os resultados demonstram que a crotoxina foi capaz de acarretar efeito antinociceptivo. Este efeito foi observado 1 h após a administração da primeira dose de CTX e este efeito durou sempre até a administração da dose seguinte (Figura 10B). O efeito antinociceptivo da CTX foi observado até o 10º dia (Figura 10A). O efeito hipernociceptivo do grupo controle foi observado por todo período de avaliação (Figura 10A). Após o 12º dia, a avaliação da hipernocicepção foi suspensa devido ao aparecimento das alterações motoras nos animais (Figura 10).

Os sinais clínicos do grupo controle, tratado com salina, começaram a surgir a partir do 10º dia após a imunização, enquanto que os sinais clínicos dos animais do grupo tratado com CTX começaram a aparecer a partir do 12º dia. Ainda, a intensidade dos sinais clínicos do grupo CTX foi menor do que a apresentada pelo grupo controle (Figura 11). No 16º dia após a imunização, 62,5% dos animais do grupo controle apresentavam sinais da doença enquanto que apenas 37,5% dos animais do grupo tratado com crotoxina apresentavam alterações clínicas. Já no 24º dia após a imunização 87,5% dos animais do grupo controle apresentavam os sintomas desta doença, enquanto que o grupo experimental, neste mesmo período, apresentou 62,5% de animais com algum grau de alteração (Figura 12), mostrando

que, além de interferir com o início e a intensidade da doença, o tratamento prolongado com a crotoxina também acarreta menor incidência da doença entre os animais imunizados.

O tratamento prolongado com a CTX também foi efetivo em aumentar o tempo de permanência dos animais no Rota Rod. Os resultados demonstram que os animais do grupo controle tiveram diminuição na coordenação motora, representada pela queda no tempo de permanência na barra giratória, a partir do 14^o dia após a imunização. O grupo experimental, tratado com CTX, também apresentou alteração na atividade motora, porém, não tão acentuada quanto o grupo controle (Figura 13).

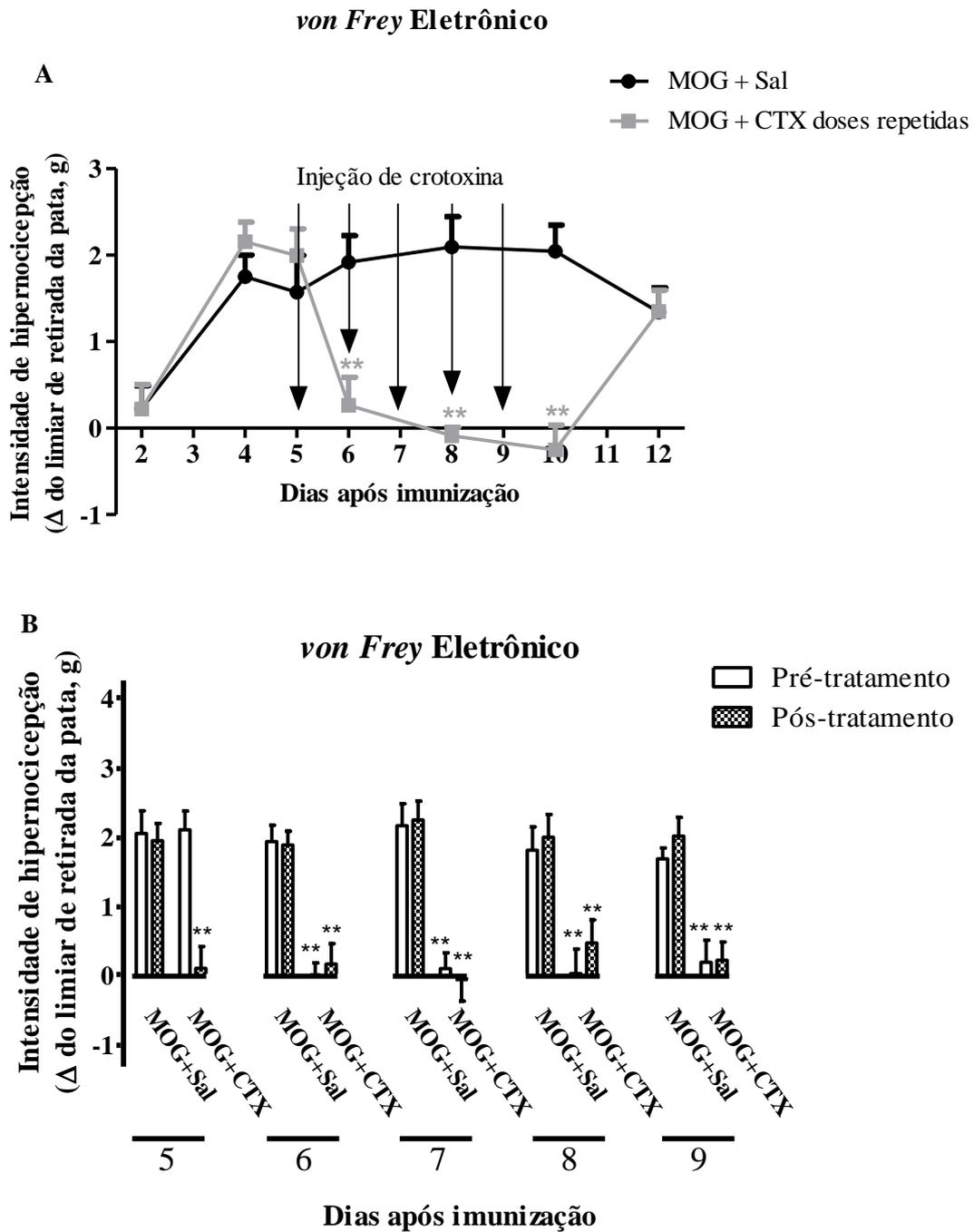


Figura 10: Avaliação do efeito da crotoxina (5 doses seguidas) na hipernocicepção de animais portadores de EAE. As alterações de sensibilidade dolorosa foram avaliadas utilizando-se o teste de *von Frey* eletrônico. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. A partir do 5º dia após a imunização, os animais receberam uma dose diária de crotoxina (40 µg/kg) por via s.c. ou salina (grupo controle), por 5 dias (dias 5, 6, 7, 8 e 9 pós-imunização) e foram avaliados até o 12º dia (Painel A). No 5º dia, os animais foram avaliados antes e 1 h após a administração de crotoxina (Painel B). Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) p<0,05 em relação ao grupo controle. (#) p<0,05 em relação à medida antes do tratamento.

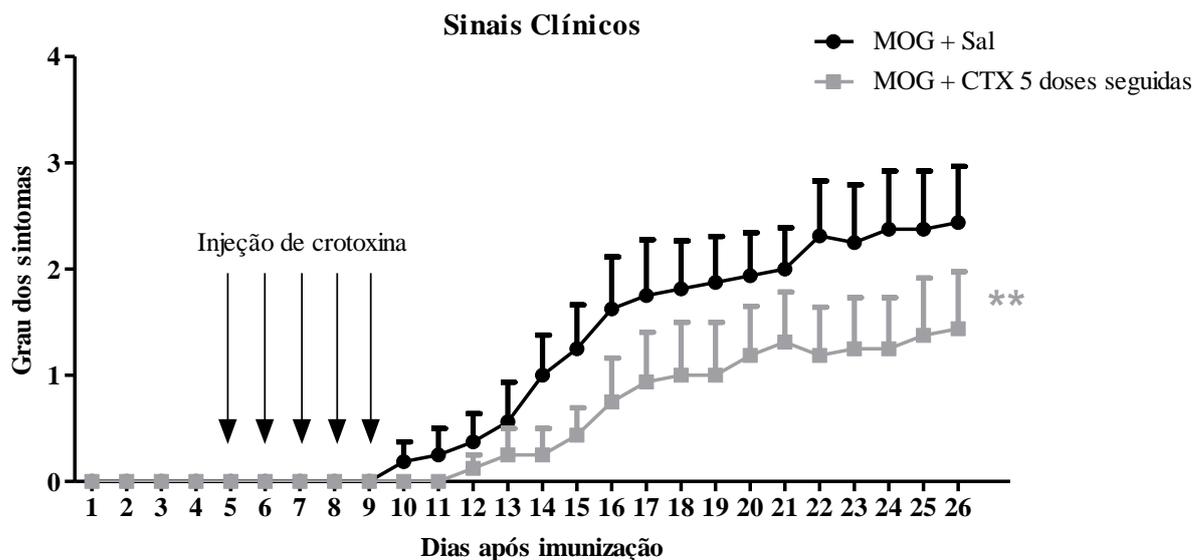


Figura 11: Avaliação do efeito da crotoxina (5 doses seguidas) nos sinais clínicos de animais portadores de EAE. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. A partir do 5º dia após a imunização, os animais receberam uma dose diária de crotoxina (40 µg/kg) por via s.c. ou salina (grupo controle), por 5 dias (dias 5, 6, 7, 8 e 9 pós-imunização). Os animais foram avaliados visualmente quanto ao aparecimento dos sinais clínicos, diariamente, utilizando-se a escala de parâmetros para estes sinais, descrita no item 3.2. De acordo com os sinais apresentados, os animais receberam grau de 0 à 5. Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) p<0,05 em relação ao grupo controle.

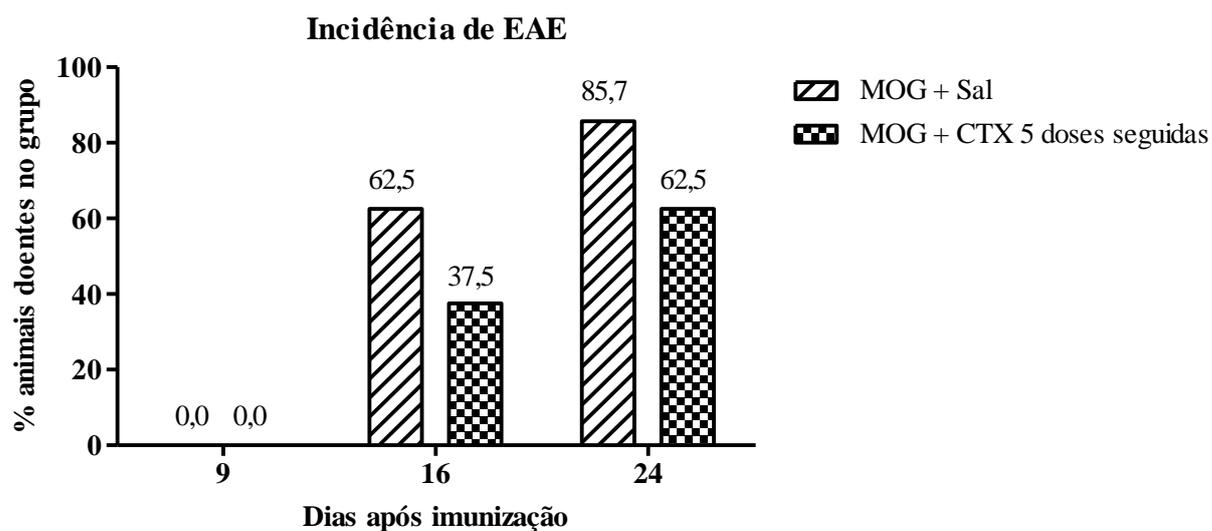


Figura 12: Incidência de EAE em animais imunizados com MOG e tratados com crotoxina. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. A partir do 5º dia após a imunização, os animais receberam uma dose diária de crotoxina (40 µg/kg) por via s.c. ou salina (grupo controle), por 5 dias (dias 5, 6, 7, 8 e 9 pós-imunização). Os animais foram avaliados visualmente quanto ao aparecimento dos sinais clínicos, diariamente, utilizando-se a escala de parâmetros para estes sinais, descrita no item 3.2. De acordo com os sinais apresentados, os animais receberam grau de 0 à 5. A incidência da doença foi apresentada em porcentagem (%) de animais doentes no grupo.

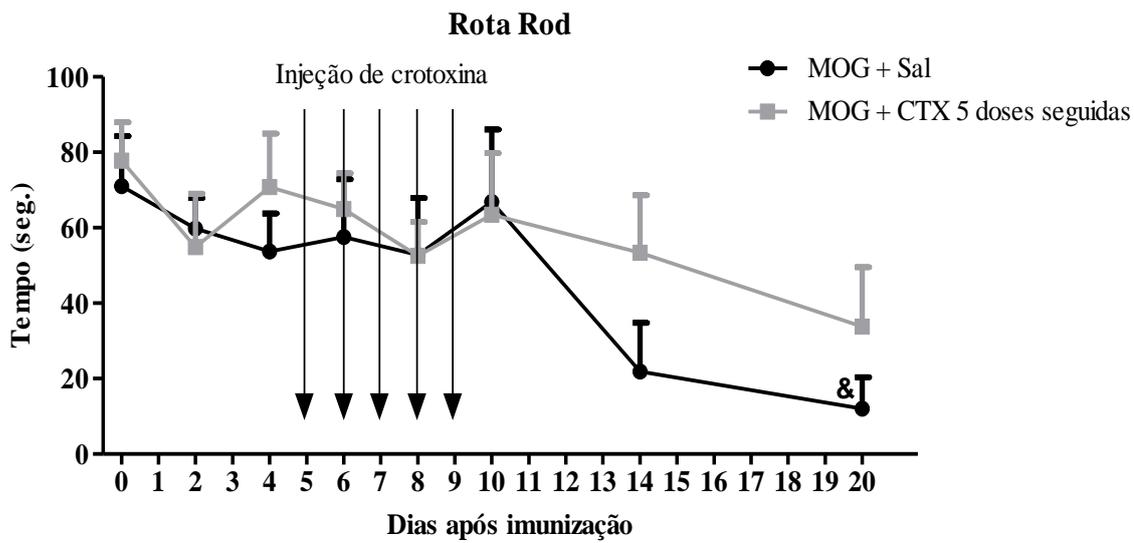


Figura 13: Avaliação das atividades motoras dos animais. As alterações da atividade motora foram avaliadas pelo teste do Rota Rod. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. A partir do 5º dia após a imunização, os animais receberam uma dose diária de crotoxina (40 µg/kg) por via s.c. ou salina (grupo controle), por 5 dias (dias 5, 6, 7, 8 e 9 pós-imunização). Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (&) $p < 0,05$ em relação à medida inicial.

4.2.2.2. Tratamento com intervalo de 3 dias entre as doses

Uma vez que a crotoxina foi capaz de acarretar uma melhora em todos os parâmetros avaliados, porém sem induzir regressão total da doença, e considerando dados anteriores que demonstram que em modelo de resposta inflamatória e em modelo tumoral o efeito da crotoxina era claramente observado quando este era administrado com intervalo de 3 dias entre cada uma das 5 injeções (Sampaio S.C., comunicação pessoal; Faiad 2008), utilizamos novo protocolo, onde a crotoxina foi injetada a cada 3 dias nos animais.

Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅, e a partir do 5º dia após a imunização receberam cinco injeções de salina ou CTX (40 µg/kg, via s.c.), sendo uma a cada 3 dias (no 5º, 8º, 11º, 14º e 17º dias após a imunização). É importante lembrar que, uma vez que a avaliação da sensibilidade dolorosa é realizada apenas até o 12º dia, os resultados representados no *von Frey* referem-se a animais que receberam apenas 3 doses de CTX. Os resultados demonstram que a administração de CTX foi capaz de reverter a hipernocicepção dos animais, por todo período de avaliação (Figura 14A). A antinocicepção foi observada 1 hora após a administração da CTX, sendo que este efeito hipernociceptivo se manteve sempre até a administração da dose seguinte (3 dias após) (Figura 14B).

Em relação aos sinais clínicos, a CTX, administrada a cada três dias, foi capaz de reduzir a intensidade destes sinais quando comparada com o grupo controle tratado com salina (Figura 15), porém esta redução não foi significativamente diferente do observado no grupo anterior tratado com CTX por 5 dias consecutivos (Figura 11).

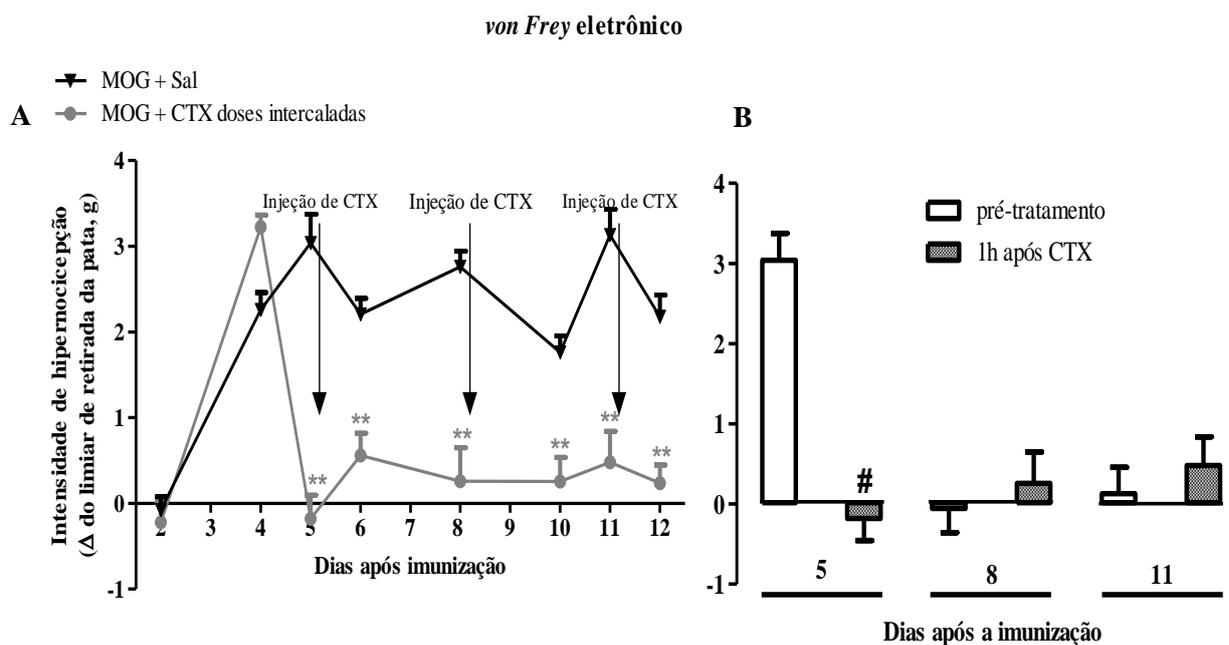


Figura 14: Avaliação do efeito da crotoxina (5 doses de 40µg/kg, uma a cada 3 dias) na hipernociceção de animais portadores de EAE. As alterações de sensibilidade dolorosa foram avaliadas pelo *von Frey* eletrônico. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. A partir do 5º dia após a imunização, os animais receberam cinco doses de crotoxina (40µg/kg) por via s.c. ou salina (grupo controle), sendo 1 dose a cada 3 dias (dias 5, 8 e 11) e foram avaliados até o 12º dia (Painel A). No 5º, 8º e 11º dias os animais foram avaliados antes e 1 h após a administração de crotoxina (Painel B). Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. (#) $p < 0,05$ em relação à medida antes do tratamento.

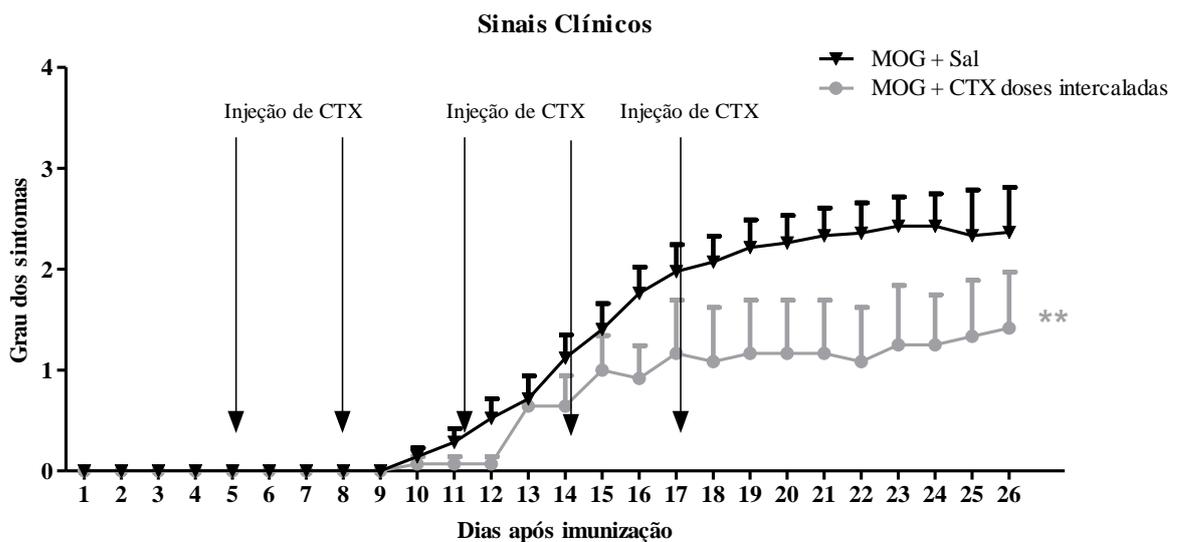


Figura 15: Avaliação do efeito da crotoxina (3 doses de 40µg/kg, uma a cada 3 dias) nos sinais clínicos de animais portadores de EAE. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. A partir do 5º dia após a imunização, os animais receberam cinco doses de crotoxina (40 µg/kg) por via s.c. ou salina (grupo controle), sendo 1 dose a cada 3 dias (dias 5, 8, 11, 14 e 17). Os animais foram avaliados visualmente quanto ao aparecimento dos sinais clínicos, diariamente, utilizando-se a escala de parâmetros para estes sinais, descrita no item 3.2. De acordo com os sinais apresentados, os animais receberam grau de 0 a 5. Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) p<0,05 em relação ao grupo controle.

4.3. Mediação química do efeito antinociceptivo da crotoxina

4.3.1. Participação dos receptores peptídeo formil no efeito antinociceptivo da CTX.

Após verificar o efeito da CTX sobre os animais portadores de EAE, investigamos a mediação química desta analgesia. Inicialmente investigamos a participação dos receptores peptídeo formil neste efeito, uma vez que, Nunes e cols (Nunes, Zychar et al. 2010) demonstraram o envolvimento desses receptores no efeito antiinflamatório da CTX no modelo de migração celular induzido por carragenina.

Para tanto, os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅, e o limiar hipernociceptivo avaliado pelo teste de *von Frey* eletrônico. A hiperalgesia surgiu no 4º dia após a imunização. No 5º dia após os animais serem avaliados no *von Frey* eletrônico, estes foram divididos em 4 grupos: grupo controle salina + salina; grupo salina + CTX (40 µg/kg, s.c.); grupo Boc 2 (antagonista de receptores peptídeo formil, na dose de 10 µg/200µl) + CTX, e grupo Boc 2 + salina. O Boc 2 foi administrado 30 minutos antes do tratamento com CTX. Este tratamento foi repetido por 5 dias consecutivos (5º, 6º, 7º, 8º e 9º dias após a imunização).

A crotoxina mais uma vez causou reversão total da hipernocicepção causada pela EAE, sendo essa antinocicepção observada até o 10º dia (Figura 16A). O Boc 2 foi capaz de reverter totalmente o efeito antinociceptivo da crotoxina nos dias 5, 6 e 7, e parcialmente nos dias 9 e 10, mostrando o envolvimento dos receptores peptídeo formil no efeito antinociceptivo da crotoxina no modelo de EAE (Figura 16A). A reversão da antinocicepção da CTX causada pelo Boc 2 foi observada uma hora após a injeção da crotoxina, perdurando até a dose seguinte (1 dia), sendo este fenômeno observado até o 8º dia após a imunização, não ocorrendo mais no 9º dia (Figura 16B). O Boc 2 não interferiu com o efeito da crotoxina no dia 8, porém teve efeito parcial no dia 9 (Figura 16B). O Boc 2 *per se* não causou nenhum efeito nos animais (dados não apresentados).

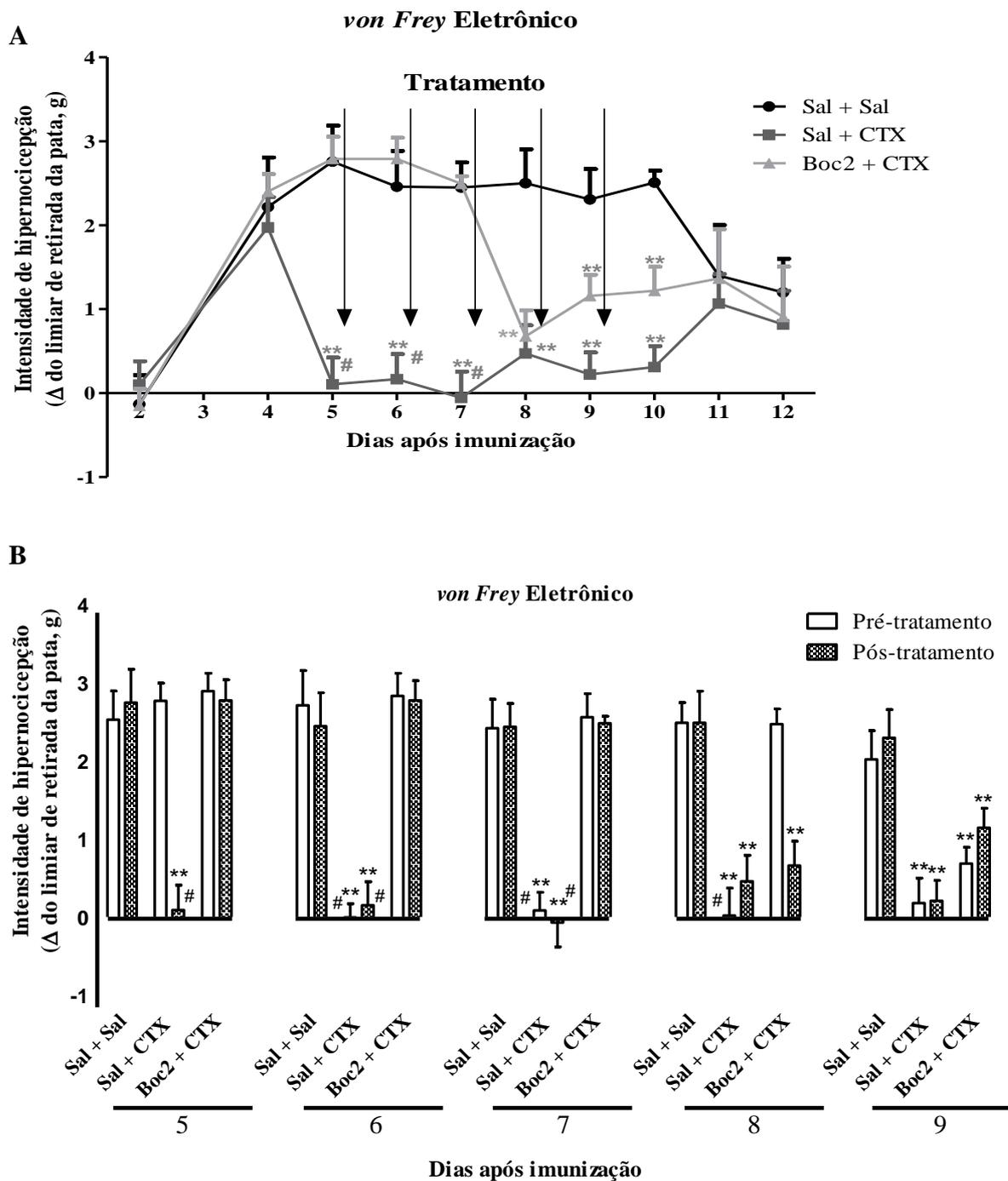


Figura 16: Avaliação da participação de receptores peptídeo formil no efeito antinociceptivo da CTX (5 doses seguidas). As alterações de sensibilidade dolorosa foram avaliadas pelo *von Frey* eletrônico. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. No 5º dia após a imunização, os animais receberam injeção de Boc 2 (10 µg/kg), 30 minutos antes da CTX (40 µg/kg, s.c.) ou salina, o tratamento foi repetido nos dias 6, 7, 8 e 9. Os animais foram avaliados até o 12º dia (Painel A). Os animais foram avaliados quanto à sensibilidade antes e 1 h após a administração de CTX (Painel B). Os dados representam a média \pm e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. (#) $p < 0,05$ em relação à medida do grupo CTX + Boc 2.

A participação dos receptores peptídeo formil foi também investigada para o efeito da CTX administrada a cada 3 dias. Novamente os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ e tratados com CTX (40 µg/kg, s.c.) a partir do 5º dia após a imunização, a cada 3 dias, ou seja, dia 5, 8 e 11 após a imunização. O Boc 2 (10 µg/200µl) foi administrado sempre 30 minutos antes do tratamento com a CTX.

Os animais apresentaram o fenômeno de hipernocicepção a partir do 4º dia após a imunização. No 5º dia, após a medida no *von Frey* eletrônico os animais foram divididos em 4 grupos: grupo controle tratado com salina; o grupo que recebeu salina + CTX; o grupo que recebeu Boc 2 + CTX; e grupo que recebeu Boc 2 + salina.

Os animais do grupo controle apresentaram hipernocicepção por todo período de avaliação (Figura 17A). O grupo que recebeu salina + CTX apresentou reversão total da hipernocicepção por todo período de avaliação (Figura 17A), enquanto que o grupo tratado com Boc 2 + CTX apresentou o fenômeno de hipernocicepção por todo o período avaliado (Figura 17A), mostrando mais uma vez o envolvimento dos receptores peptídeo formil no efeito antinociceptivo da CTX. Este efeito do Boc 2 já foi observado 1 hora após o tratamento com a CTX (Figura 17B). O efeito antinociceptivo da CTX por sua vez também foi observado sempre até a dose seguinte (Figura 17B). O Boc 2 *per se* não causou nenhuma interferência na hipernocicepção dos animais (dados não apresentados).

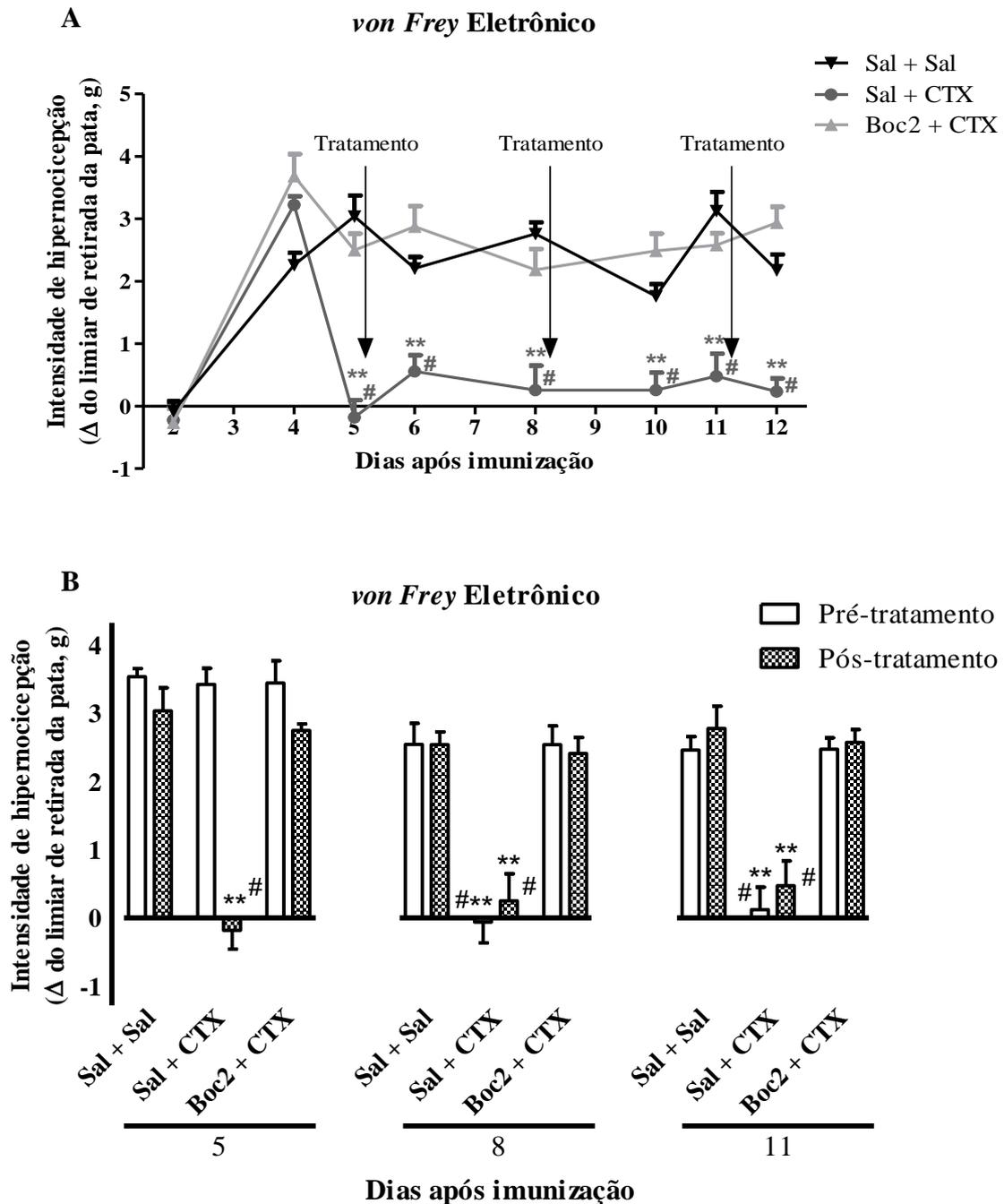


Figura 17: Avaliação da participação de receptores peptídeo formil no efeito antinociceptivo da CTX (doses intercaladas). As alterações de sensibilidade dolorosa foram avaliadas pelo *von Frey* eletrônico. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. No 5º dia após a imunização, os animais receberam injeção de Boc 2 (10 µg/kg, i.p.), 30 minutos antes da CTX (40 µg/kg, s.c.) ou salina, o tratamento foi repetido nos dias 8 e 11. Os animais foram avaliados até o 12º dia (Painel A). Os animais foram avaliados quanto à sensibilidade antes e 1 h após a administração de CTX (Painel B). Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) p<0,05 em relação ao grupo controle. (#) p<0,05 em relação à medida do grupo Boc 2 + CTX.

4.3.2. Participação da Lipoxina A₄ no efeito antinociceptivo da CTX

Comprovada a participação dos receptores peptídeo formil no efeito analgésico da CTX, e considerando que estes receptores são alvos tanto da lipoxina A₄ quanto da anexina, e que a Lipoxina A₄ está envolvida no efeito antiinflamatório da CTX no modelo de migração celular induzida por carragenina (Nunes, Zychar et al. 2010), decidimos investigamos a participação da lipoxina A₄ no efeito analgésico da CTX. Para tanto, os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅, e assim como nos ensaios anteriores, os animais apresentaram o fenômeno de hipernocicepção a partir do 4º dia após a imunização (Figura 18A). No 5º dia os animais foram avaliados novamente no ensaio de *von Frey* eletrônico, divididos em 4 grupos: grupo controle tratado com salina; grupo experimental que recebeu salina + CTX (40 µg/kg, s.c.); grupo experimental que recebeu NDGA (inibidor da via das lipoxigenases, na dose de 30 µg/kg, i.p.) + CTX (40 µg/kg, s.c.); e grupo que recebeu NDGA + salina. O antagonista foi administrado sempre 30 minutos antes de cada dose de CTX, o tratamento foi repetido por 5 dias consecutivos.

Os dados demonstram que os animais tratados com salina apresentaram hipernocicepção por todo período avaliado (Figura 18A). O grupo tratado com salina + CTX apresentou reversão total da hipernocicepção, sendo que este fenômeno foi observado até o 10º dia após a imunização (Figura 18A). O tratamento com NDGA foi capaz de reverter totalmente a antinocicepção causada pela CTX nos dias 5, 6 e 7 (Figura 18A). O efeito do NDGA foi observado já na 1ª hora após a injeção da CTX (Figura 18B) e perdurou até a dose seguinte, ou seja, 1 dia (Figura 18B). Porém, no 8º dia após os tratamentos o NDGA não apresentou mais seu efeito bloqueador sobre a CTX (Figura 18B), isto também foi observado no 9º dia (Figura 18B). O NDGA *per se* não alterou o limiar hipernociceptivo dos animais (dados não apresentados).

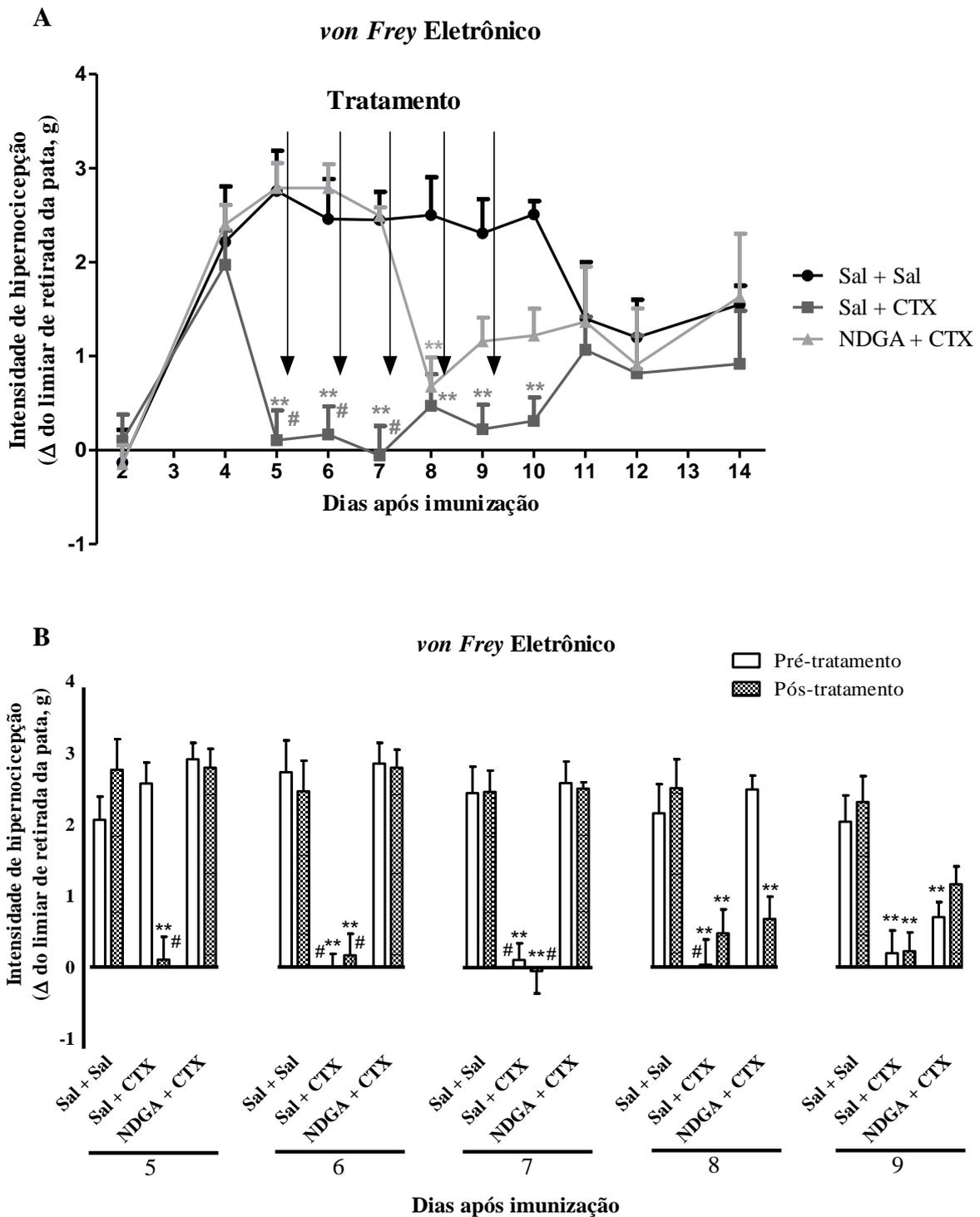


Figura 18: Avaliação da participação da Lipoxina A₄ no efeito antinociceptivo da CTX (doses repetidas). As alterações de sensibilidade dolorosa foram avaliadas pelo teste de *von Frey* eletrônico. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. No 5º dia após a imunização, os animais receberam injeção de NDGA (30 µg/kg, i.p.), 30 minutos antes da CTX (40 µg/kg, s.c.) ou salina, o tratamento foi repetido nos dias 6, 7, 8, 3 e 9. Os animais foram avaliados até o 12º dia (Painel A). Os animais foram avaliados quanto à sensibilidade antes e 1 h após a administração de CTX (Painel B). Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) p<0,05 em relação ao grupo controle. (#) p<0,05 em relação à medida do grupo NDGA + CTX.

4.3.3. Participação dos Receptores Muscarínicos no efeito antinociceptivo da CTX

Após verificar a participação de receptores peptídeo formil e da lipoxina A₄ no efeito antinociceptivo da CTX no modelo de EAE induzido por MOG₃₅₋₅₅, investigamos também a participação de receptores muscarínicos neste efeito. Nogueira-Neto e cols (Nogueira-Neto, Amorim et al. 2008) demonstraram que o efeito antinociceptivo da CTX no modelo de dor neuropática causada pela transecção do nervo isquiático era mediado por receptores muscarínicos. Portanto, utilizamos o sulfato de atropina a fim de verificar se no modelo de EAE, o efeito antinociceptivo da CTX também envolve a participação destes.

Para tanto, os animais foram imunizados com MOG e no 4^o dia após a imunização foi observado o fenômeno de hipernocicepção. No 5^o dia, após os animais serem avaliados através de *von Frey* eletrônico os mesmos foram divididos em 4 grupos: grupo tratado com salina; grupo tratado com salina + CTX (40 µg/kg, s.c.); grupo tratado com sulfato de atropina (antagonista de receptores muscarínicos, 10 mg/kg, i.p.) + CTX (40 µg/kg, s.c.); e grupo tratado com sulfato de atropina + salina. O antagonista foi sempre administrado 30 minutos antes da injeção de CTX, sendo este tratamento repetido por 5 dias consecutivos.

Os resultados demonstram que os animais que receberam salina apresentaram hipernocicepção por todo período avaliado (Figura 19A). O grupo tratado com salina + CTX apresentou reversão total da hipernocicepção característica da doença, reversão esta observada até o 10^o dia (Figura 19A). O sulfato de atropina bloqueou totalmente o efeito antinociceptivo da CTX (Figura 19A). O efeito inibitório do sulfato de atropina sobre a antinocicepção causada pela CTX foi observado 1 hora após os animais terem recebido a injeção de CTX, sendo este efeito sempre observado até a dose seguinte do antagonista (1 dia) (Figura 19A). O sulfato de atropina *per se* não causou nenhuma alteração no limiar hipernociceptivo dos animais (dados não demonstrados).

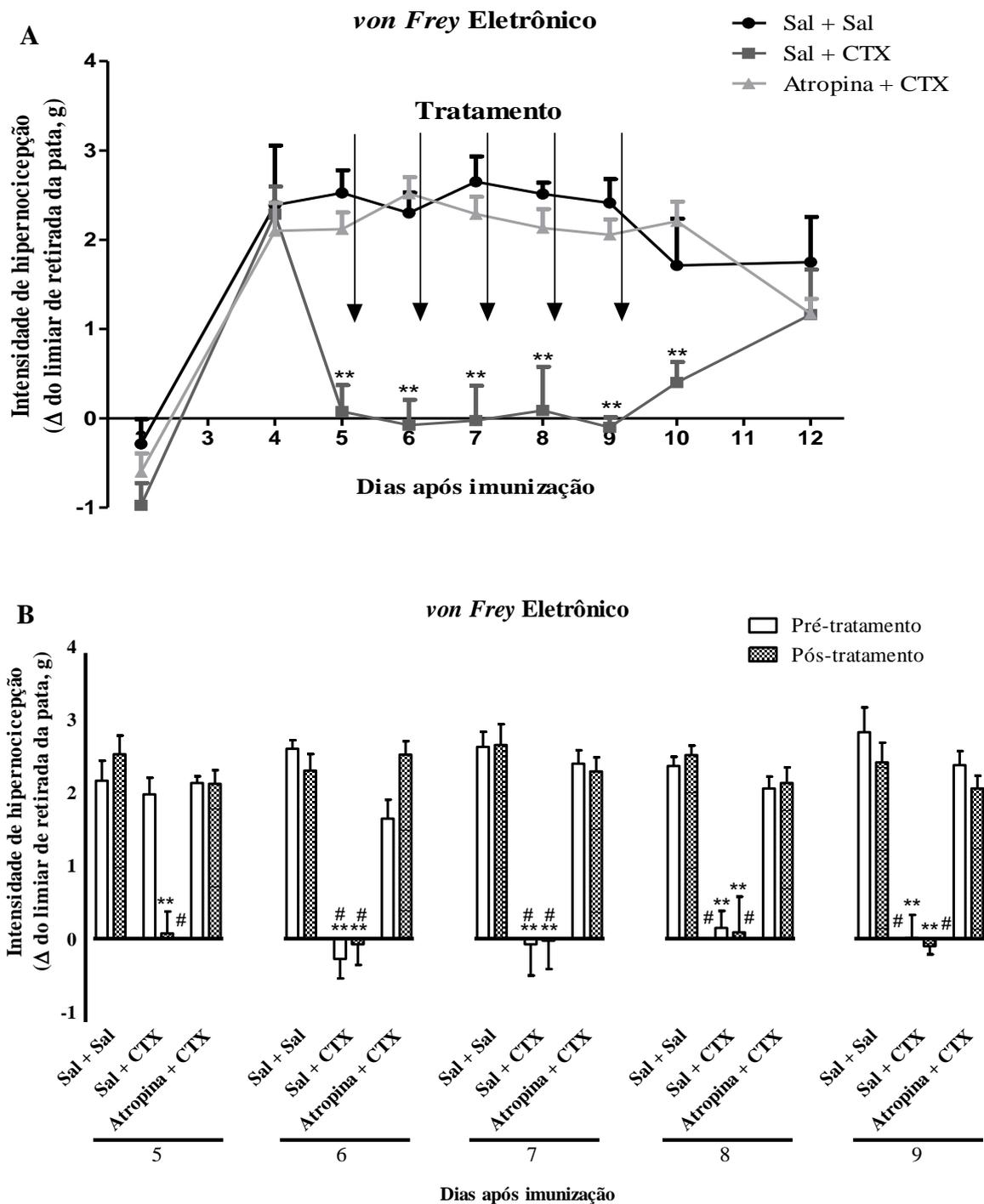


Figura 19: Avaliação da participação de receptores muscarínicos no efeito antinociceptivo da CTX (doses repetidas). As alterações de sensibilidade dolorosa foram avaliadas pelo *von Frey* eletrônico. Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ diluído em CFA por via s.c. e imediatamente após a imunização e 48h depois receberam a toxina pertussis por via i.p. No 5º dia após a imunização, os animais receberam injeção de sulfato de atropina (10 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes da CTX (40 µg/kg, s.c.) ou salina, o tratamento foi repetido nos dias 6, 7, 8, 3 e 9. Os animais foram avaliados até o 12º dia (Painel A). Os animais foram avaliados quanto à sensibilidade antes e 1 h após a administração de CTX (Painel B). Os dados representam a média ± e.p.m. de 9-10 animais por grupos. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. (#) $p < 0,05$ em relação à medida do grupo atropina + CTX.

5. DISCUSSÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC), que afeta mais de 2,5 milhões de pessoas no mundo todo. É uma desordem de origem autoimune, na qual o sistema imunológico reconhece como antígenos componentes do sistema nervoso central, mais especificamente peptídeos que constituem a bainha de mielina dos axônios de neurônios (Sloane, Ledebor et al. 2009). Observa-se auto-agressão ao SNC, mediada por linfócitos T (Martin, McFarland et al. 1992), além de marcante ativação de células da glia (microglia e astrócitos), tanto na medula espinal como em regiões supraespinais do SNC (Petzold, Eikelenboom et al. 2002), ativação de células da imunidade inata, além de citocinas e quimiocinas (Szcucinski and Losy 2007; Sloane, Ledebor et al. 2009), essa resposta inflamatória altera profundamente as propriedades dos neurônios (Viviani, Bartesaghi et al. 2003), acarretando desmielinização e perda axonal, fenômenos característicos da esclerose múltipla (Brück 2005; Sloane, Ledebor et al. 2009). Como consequência, diversas alterações motoras, cognitivas e sensoriais são observadas (Aicher, Silverman et al. 2004; Hirsh, Turner et al. 2009).

No intuito de investigar melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da esclerose múltipla (EM), e mesmo para o estudo de drogas com potencial terapêutico, diversos modelos animais de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) têm sido desenvolvidos para tentar reproduzir as alterações anatômicas e comportamentais observadas na esclerose múltipla em humanos. Neste projeto, utilizamos o MOG₃₅₋₅₅ como antígeno para imunização, uma vez que trabalhos da literatura demonstraram que, neste modelo, a dor aparece anteriormente aos sinais clínicos e às alterações motoras (Olechowski, Parmar et al. 2009; Rodrigues, Sachs et al. 2009; Lisi, Navarra et al. 2012; Yuan, Shi et al. 2012), permitindo o estudo destes fenômenos isoladamente.

Inicialmente realizamos a implementação deste modelo de EAE em nosso laboratório. Para tanto, utilizamos camundongos fêmeas C57BL/6. A utilização de animais fêmeas se baseia em dados epidemiológicos mostrando que a incidência de EM é maior em mulheres do que em homens, e que existe um componente hormonal que facilita a instalação da doença, sendo que esta manifesta-se

experimentalmente mais facilmente em fêmeas do que em machos (Basso, Frenkel et al. 2008; Rodrigues, Sachs et al. 2009). Os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅, e avaliados quanto a sensibilidade dolorosa (no teste de *von Frey* Eletrônico), quanto a coordenação motora (no teste do Rota Rod) e quanto ao aparecimento dos sinais clínicos. Os animais tratados com MOG₃₅₋₅₅ tiveram alteração da sensibilidade dolorosa a partir do 4º dia após a imunização, sendo que este efeito manteve-se até o 12º dia, período em que estas avaliações não foram mais realizadas uma vez que as alterações motoras dos animais interferem com a resposta no *von Frey* eletrônico. Os animais do grupo controle, tratados com CFA, não tiveram alterações significativas nas suas respostas nociceptivas por todo período de avaliação. Os sinais clínicos dos animais imunizados com MOG começaram a surgir a partir do 10º dia após a imunização, e a progressão da doença foi crescente, até aproximadamente o 24º dia, quando ocorreu uma pequena diminuição da intensidade dos sinais seguida da estabilização. Esses resultados estão de acordo com os dados da Literatura que descrevem o curso da doença (Basso, Frenkel et al. 2008). Concomitantemente foi realizado o teste do Rota Rod, onde foi possível visualizar a diminuição do tempo de permanência no aparelho, dos animais imunizados com MOG somente quando os sinais clínicos começaram a progredir, enquanto os animais controle mantiveram sua capacidade motora sem alterações significativas, comprovando a diminuição da atividade e coordenação motoras em decorrência dos sinais clínicos. Estes dados confirmam que a hipernocicepção realmente precede o aparecimento dos sinais clínicos, neste modelo de imunização por MOG₃₅₋₅₅, possibilitando o estudo de dor independentemente dos sinais clínicos, corroborando os dados de Rodrigues e cols. (Rodrigues, Sachs et al. 2009), Olechowski e cols (Olechowski, Parmar et al. 2009), Yuan e cols. (Yuan, Shi et al. 2012) e Lisi e cols. (Lisi, Navarra et al. 2012). Nossos dados demonstram, ainda, que o CFA, *per se*, não acarreta alteração na sensibilidade dolorosa ou mesmo alterações da atividade motora dos animais.

A dor na esclerose múltipla pode ser de origem neuropática ou músculo-esquelética, aguda ou crônica. Na maioria dos casos, o indivíduo apresenta dor crônica, severa e difusa, interferindo com diversos aspectos da sua vida, entre eles o sono, a recreação e atividades ocupacionais, sendo que nesta fase os pacientes apresentam, ainda, graves sintomas de depressão (Ehde, Osborne et al. 2006;

Osborne, Jensen et al. 2007; Hirsh, Turner et al. 2009; Sloane, Ledebøer et al. 2009). A dor na esclerose múltipla pode ser originária de diferentes fatores, entre eles, a inflamação característica desta doença, dor neuropática resultante da lesão do sistema nervoso central, parestesia resultante da lesão de neurônios do gânglio dorsal da medula espinal, neuralgia decorrente de lesão no trigêmeo, dor secundária resultante de espasmos e contrações musculares decorrentes de desmielinização do tronco cerebral ou da medula espinal e hipertonicidade muscular secundária à lesões dos tratos corticoespinal, corticobulbar ou bulboespinal. Ainda, podem ser observadas dores de origem músculo-esquelética resultantes de anormalidade postural e enxaquecas (Ehde, Osborne et al. 2005; Osborne, Jensen et al. 2007). Com relação aos nossos resultados, mostrando o aparecimento da dor em tempo anterior à instalação das alterações motoras e em período tão curto após a imunização dos animais, sabe-se que a dor neuropática central em modelos animais de EAE surge devido a uma inflamação prolongada na medula espinal, que resulta em ativação de células da glia e agressão à bainha de mielina, causando hipersensibilidade dolorosa (Olechowski, Parmar et al. 2009). Assim, a ativação de astrócitos e microglias na medula espinal parece ser elemento chave no desenvolvimento da dor neuropática periférica (Inoue and Tsuda 2009; Milligan and Watkins 2009), reduzindo o limiar hipernociceptivo dos animais antes de ocorrer a disfunção neurológica (Thibault, Calvino et al. 2011).

Após a implementação do modelo de EAE, avaliamos o efeito da crotoxina em animais imunizados com MOG. Nossos dados demonstram o potente efeito antinociceptivo da crotoxina, quando administrada em dose única (40 µg/kg), por via s.c., sendo esta uma dose sabidamente não tóxica (Nunes, Zychar et al. 2010). O efeito da crotoxina foi detectado 1 hora após o tratamento, perdurando até o 10º dia após a imunização, sendo considerado, portanto, um efeito de longa duração (pelo menos 5 dias após uma única dose). Contudo, a crotoxina (única dose) não foi capaz de interferir com o aparecimento dos sinais clínicos, ou mesmo com a alteração da atividade motora, avaliada no teste do Rota Rod (dados não apresentados).

Dados da literatura já haviam demonstrado efeito analgésico e antiinflamatório de longa duração para a crotoxina, após administração única. Nogueira e col (Nogueira-Neto, Amorim et al. 2008) demonstraram efeito antinociceptivo de longa

duração, em modelo de dor persistente induzida por transecção do nervo isquiático. Nesse trabalho, os autores demonstraram que a crotoxina, quando administrada no coto do nervo seccionado, no momento da cirurgia, impede a instalação da dor por até 60 dias. Esse efeito antinociceptivo envolve a participação de receptores muscarínicos centrais e de derivados da via da 5-lipoxigenase. Nunes e col (Nunes, Zychar et al. 2010) demonstraram efeito antiinflamatório de longa duração para esta toxina. Nestes estudos, os autores demonstraram que a crotoxina é capaz de inibir tanto edema de pata quanto migração celular para a cavidade peritoneal, induzidos por carragenina, mesmo quando administrada diversos dias antes da inflamação (7 dias antes da indução do edema e 7, 14 ou mesmo 21 dias antes da indução da migração celular). Assim, nossos dados demonstram, uma vez mais, o efeito de longa duração da crotoxina.

A partir destes resultados, utilizando uma única dose de crotoxina, realizamos outro protocolo, onde a crotoxina foi administrada por 5 dias consecutivos. A escolha deste protocolo se baseou em resultados anteriores demonstrando que, em modelos de dor ou hiperalgisia persistente, o efeito da crotoxina só pode ser observado após tratamento prolongado por 5 dias (Sampaio e cols, comunicação pessoal, Brigatte e col, comunicação pessoal; Faiad 2008). Os resultados demonstraram que o efeito antinociceptivo da crotoxina, avaliado no teste do *von Frey* eletrônico, foi observado já na 1ª hora após o tratamento, sendo este efeito mantido pelo menos até o 10º dia. No grupo controle, a hiperalgisia observada no 4º dia manteve-se até o 12º. Estes resultados demonstram que, para o efeito antinociceptivo, não há diferença entre a administração de uma única dose ou de 5 doses consecutivas. Com relação aos sinais clínicos, os animais tratados com crotoxina apresentaram um atraso no aparecimento destes sinais clínicos e ainda apresentaram estes sinais em intensidade menor do que o grupo controle. Adicionalmente houve diminuição da incidência da doença nos animais do grupo tratado com crotoxina. Estes dados demonstram a capacidade da crotoxina, administrada cronicamente, em interferir com o desenvolvimento da EAE, e ainda sugerem que diferentes mecanismos são responsáveis pelo efeito da crotoxina sobre as alterações de sensibilidade dolorosa e sobre os sinais clínicos. Estes resultados, ainda, evidenciam seu potencial terapêutico, uma vez que os tratamentos atuais para esclerose múltipla são capazes

apenas de impedir a progressão da doença, não sendo possível a reversão do quadro do paciente.

Com relação ao fato de termos utilizado, neste último tratamento, 5 doses consecutivas da crotoxina na mesma dose utilizada no tratamento agudo (40 µg/kg), e sendo esta a dose não tóxica conhecida, é importante esclarecer: 1- Brigatte e cols. (dados não publicados) demonstraram ser este o protocolo efetivo, para interferir com a dor e com a evolução do edema induzidos pelo tumor de Walker 256, quando administrado na pata de ratos; 2- Diversos trabalhos da Literatura mostrando efeito imunomodulador da crotoxina foram realizados utilizando dose ainda superior (5 mg/kg) à soma das 5 doses utilizadas neste trabalho (200 µg/kg) (Okamoto, Viskatis et al. 1993; Cardoso, Lopes-Ferreira et al. 2001; Rangel-Santos, Lima et al. 2004); 3- Barral-Netto e von Sohsten (Barral-Netto and von Sohsten 1991) demonstraram, em camundongos, uma rápida eliminação da crotoxina do organismo. Neste trabalho, os autores demonstraram que a crotoxina, após injeção s.c. de 10 µg, é detectada no soro de camundongos na concentração de 254 ± 141 ng/ml de soro 15 minutos após a injeção da toxina, é detectada na concentração de $3,9 \pm 0,5$ ng/ml após 30 minutos e indetectável após este período, o que sugere que, mesmo após seguidas administrações, não há acúmulo de crotoxina no organismo ; 4- Okamoto e col (Okamoto, Viskatis et al. 1993) demonstraram que o tratamento diário com crotoxina acarreta o desenvolvimento de tolerância ao seu efeito tóxico. Neste trabalho, os autores demonstraram que camundongos podem ser tratados diariamente com doses de crotoxina de 20 a 35 vezes maiores do que a DL 50 original sem qualquer sinal de toxicidade. Ainda, esta tolerância não é decorrente da produção de anticorpos, mas sim de um efeito de dessensibilização pré-sináptico. É importante esclarecer que, nos nossos ensaios, mesmo após 5 doses consecutivas não houve perda de nenhum animal por intoxicação ou morte.

Os resultados obtidos no ensaio anterior demonstraram que a crotoxina foi capaz de bloquear totalmente a hipernocicepção, porém, em relação ao desenvolvimento e intensidade da doença, sua reversão foi apenas parcial. Assim, baseado nos fatos de que, para a antinocicepção, a crotoxina induziu efeito prolongado, e em dados do nosso grupo que demonstraram que em modelo de resposta inflamatória e em modelo tumoral o efeito da crotoxina foi melhor observado quando esta foi administrada com intervalo de 3 dias entre cada uma das

5 injeções (Sampaio S.C., comunicação pessoal; Faiad 2008), utilizamos novo protocolo, avaliando a efetividade da crotoxina quando administrada, novamente em 5 doses, porém sendo uma a cada 3 dias. É importante lembrar que, para a avaliação da sensibilidade dolorosa, uma vez que esta é realizada apenas até o 12º dia, os dados referem-se a animais que receberam apenas 3 doses de CTX. Nossos dados demonstram que a crotoxina novamente acarretou antinocicepção, observada por todo período de avaliação. Ainda, novamente a crotoxina interferiu com o desenvolvimento e a intensidade da EAE, porém este efeito não foi diferente do obtido quando a crotoxina foi administrada por 5 dias consecutivos.

Os dados obtidos neste estudo, onde não houve diferença no efeito da crotoxina quando administrada por 5 dias consecutivos ou a cada 3 dias, sugerem que, uma vez que a crotoxina apresenta efeito de longa duração [chegando até a 21 dias, segundo Nunes et al (Nunes, Zychar et al. 2010)], a alteração do nosso esquema de tratamento não foi capaz de prorrogar ainda mais seu efeito ou, ainda, aumentar sua eficácia. Baseado nos resultados demonstrados até o momento, o protocolo com administrações consecutivas de crotoxina por 5 dias foi utilizado para a continuidade do projeto.

Como mencionada anteriormente a Esclerose Múltipla não tem cura, e dependendo do tipo de dor persistente e dos sinais clínicos apresentados pelo paciente, diferentes medicamentos podem ser utilizados clinicamente. Dentre estes, podemos citar: paracetamol, baclofeno e diazepam (utilizados para reduzir a espasticidade) (O'Connor, Schwid et al. 2008), antidepressivos e anticonvulsivantes (Finnerup, Gottrup et al. 2002; Dworkin, Backonja et al. 2003; Finnerup, Otto et al. 2005; Attal, Cruccu et al. 2006), e também analgésicos opióides, tramadol e inibidores de captação de serotonina e norepinefrina (Dworkin, Backonja et al. 2003; Finnerup, Otto et al. 2005). Também são utilizados imunomoduladores como o interferon 1 β e acetato glatirâmer (Croze, Yamaguchi et al. 2012; Gasperini and Ruggieri 2012; Meuth, Gobel et al. 2012) e os corticosteroides que são os mais utilizados atualmente (Nicholas and Rashid 2012). Thibault e cols (Thibault, Calvino et al. 2011) avaliando experimentalmente em animais algumas drogas que geralmente são utilizadas no tratamento da esclerose múltipla, observaram que o tratamento de animais portadores de EAE, após o surgimento dos sinais clínicos, com acetaminofeno, gabapentina, tramadol e duloxetina, não acarretou alteração do

curso da doença em nenhum dos animais testados. Assim, ainda é nosso objetivo avaliar se, quando administrada após o surgimento dos sinais clínicos, a CTX mantém sua capacidade em diminuir os sinais clínicos e o comprometimento motor dos animais.

Após verificar o efeito da CTX sobre os animais com EAE, avaliamos a mediação química do efeito antinociceptivo desta toxina na hipernocicepção característica da EAE. Para tanto, primeiramente analisamos a participação dos receptores peptídeo formil. Esses receptores pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (Cattaneo, Guerra et al. 2010; Dufton and Perretti 2010), e apresentam diversas funções biológicas, como por exemplo, percepção de odores, crescimento de cabelo e controle de algumas reações inflamatórias como a dor e a migração celular. No sítio inflamatório, os receptores peptídeo formil controlam o influxo celular, e desempenham um papel crucial na atividade fagocítica de macrófagos (Dufton and Perretti 2010). Já foi demonstrado na literatura que o efeito antiinflamatório da CTX é mediado por receptores peptídeo formil no modelo de migração celular induzida por carragenina (Nunes, Zychar et al. 2010). Os nossos resultados mostraram que o Boc 2 (antagonista de receptores peptídeo formil) foi capaz de bloquear o efeito antinociceptivo da CTX em animais portadores e EAE, demonstrando que os receptores peptídeo formil também estão envolvidos no efeito antinociceptivo da CTX, neste modelo.

Uma vez que os receptores peptídeo formil são alvo tanto da lipoxina A₄ quanto da anexina, investigamos se o efeito da crotoxina neste modelo seria em decorrência da ação da lipoxina A₄. As lipoxina A₄, são mediadores lípidicos produzidos a partir do ácido araquidônico pela via das lipoxigenases, durante a interação intracelular entre leucócitos e células residentes no curso da resposta inflamatória (Dufton and Perretti 2010; Nunes, Zychar et al. 2010), que têm a função de interromper o processo inflamatório (Chiang, Serhan et al. 2006). Svensson e cols. (Svensson, Zattoni et al. 2007) demonstraram que as lipoxinas atenuam a nocicepção, não apenas no local da inflamação, mas também através da interferência com o processamento da dor na medula espinal. Na periferia, as lipoxinas poderiam interferir com a nocicepção e com a regulação e a comunicação entre os sistemas imunológico e nervoso sensorial (Svensson, Zattoni et al. 2007). Dados da literatura sugerem que devido à importância da lipoxina A₄ em processos

inflamatórios, a diminuição da produção da mesma poderia causar o início e/ou perpetuação da inflamação na EM (Das 2012). Já foi demonstrado na literatura que o efeito antiinflamatório da crotoxina é mediado por mediadores lipídicos derivados da via das lipoxigenases, (Sampaio, Santos et al. 2006; Zambelli, Sampaio et al. 2008) sendo que a crotoxina promove, ainda, aumento da secreção de lipoxina A₄, que tem sua ação mediada pelos receptores peptídeo formil (Nunes, Zychar et al. 2010). Nossos dados demonstraram que o NDGA (inibidor da via das lipoxigenases) foi capaz de bloquear o efeito antinociceptivo da CTX em animais imunizados com MOG. Esses dados, em conjunto com os dados mostrando a reversão do efeito da crotoxina pelo Boc 2, antagonista de receptores peptídeo formil, sugerem a participação da lipoxina A₄ neste efeito.

O passo seguinte foi avaliar se os receptores muscarínicos também estão envolvidos na resposta antinociceptiva da CTX. A família de receptores muscarínicos consiste em cinco receptores metabotrópicos, M1 - M5 (Wess, Duttaroy et al. 2003; Scarr 2012). Estes receptores são preferencialmente acoplados a distintas proteínas G. Os receptores M1, M3, e M5 são acoplados na subunidade G_{αq/11}, e levam à ativação da fosfolipase C e os receptores M2 e M4 estão acoplados a subunidades G_{αi/o}, resultando na inibição da adenilil ciclase (Scarr 2012). Estes receptores medeiam às várias funções muscarínicas da acetilcolina (Wess, Duttaroy et al. 2003). Wess e cols (Wess, Duttaroy et al. 2003) realizaram um estudo para verificar a participação dos receptores muscarínicos centrais na analgesia. Neste estudo, sugere-se que os receptores M2 e M4 estão envolvidos no efeito analgésico causado pelos agonistas muscarínicos em nível espinal e supra-espinal, provavelmente devido aos níveis elevados de expressão destes subtipos na medula espinal. Ainda, tem sido mostrado que as células gliais expressam colina-acetiltransferase (ChAT) e sintetizam acetilcolina. Kooi e cols (Kooi, Prins et al. 2011) coletaram tecidos *post-mortem* de pacientes com EM e observaram que existe um desequilíbrio na neurotransmissão colinérgica do hipocampo desses pacientes, com uma redução na síntese de acetilcolina, mas a degradação do neurotransmissor não é alterada. Nogueira-Neto e cols (Nogueira-Neto, Amorim et al. 2008) demonstraram que o efeito antinociceptivo da CTX é mediado por receptores muscarínicos no modelo de dor crônica induzida pela transecção do nervo isquiático. Nossos resultados corroboram com esses dados, confirmando a participação desses

receptores no efeito antinociceptivo da CTX no modelo de EAE. Em contraste, Zhang e cols (Zhang, Han et al. 2006) utilizando modelos de dor aguda e ensaios eletrofisiológicos não observaram a participação desses receptores no efeito antinociceptivo da CTX. No entanto, as diferenças no modelo experimental para avaliação da dor podem contribuir para esses resultados distintos.

Em resumo, nossos dados confirmam a crotoxina como um agente capaz de interferir tanto com a dor como com os sinais clínicos da EAE, ampliando o conhecimento das possíveis ações terapêuticas desta toxina, bem como evidenciam o potencial terapêutico da crotoxina na esclerose múltipla.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos até o presente momento, podemos concluir que a crotoxina apresenta um potente efeito antinociceptivo no modelo de EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅, sendo este efeito de longa duração, persistindo por até 5 dias após uma única administração. Os dados obtidos comprovam também que a crotoxina, quando administrada cronicamente, além de acarretar antinocicepção, é capaz de interferir com o desenvolvimento e a intensidade dos sinais clínicos característicos desta doença. O efeito antinociceptivo da crotoxina é mediado pelos receptores peptídeo formil, por ação da Lipoxina A₄, e também envolvem a participação de receptores muscarínicos centrais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICHER, S. A., SILVERMAN, M. B. et al. Hyperalgesia in an animal model of multiple sclerosis. **Pain**, v. 110, n. 3, p. 560-570, 2004.

AIRD, S. D., YATES 3rd, J. R. et al. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1040, n. 2, p. 217-224, 1990.

AMORIN, M., F. D. M. R., et al. Envenenamento botrópico e crotálico. In: **Mem. Inst. Butantan**, Ed. 23, São Paulo, 1951, p. 63-108.

ATTAL, N., CRUCCU, G. et al. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. **European J Neur**, v. 13, n.11, p. 1153-1169, 2006.

AZEVEDO-MARQUES, M. M., C. P., et al. Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. In: **S. Schvartsman: Acidente Crotálico**, 1992, p. 161-167.

BAILEY, P. AND WILCE J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg Med (Fremantle)** v. 13, n. 1, p. 28-36. 2001.

BARRAL-NETTO, M. AND VON SOHSTEN R. L. Serum kinetics of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice: evidence for a rapid clearance. **Toxicon** v. 29, n. 4-5, p. 527-531, 1991.

BASSO, A. S., FRENKEL D., et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1532-1543, 2008.

BAXTER, A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 11, p. 904-912, 2007.

BJARTMAR, C., WUJEK J. R., et al. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. **J Neur Scienc**, v. 206, n. 2, p. 165-171, 2003.

BON, C., BOUCHIER, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1989.

BORNSTEIN, M. B. AND APPEL, S. H. Demyelination in cultures of rat cerebellum produced by experimental allergic encephalomyelitic serum. **Trans Am Neurol Assoc**, v. 84, p. 165-166, 1959.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAZIL, O. V. Neurotoxins from the South American rattle snake venom. **Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi**, v. 71, n. 6, p. 394-400, 1972.

BRAZIL, V. Do emprego da peçonha na terapêutica, São Paulo, 1934.

BRÜCK, W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. **J Neurology**, v. 252, n. 0, p. v3-v9, 2005.

CARDOSO, D. F., LOPES-FERREIRA, M. et al. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators Inflamm**, v. 10, n. 3, p. 125-133, 2001.

CARDOSO, D. F. AND MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p. 607-612, 1997.

CASTRO, F. R., FARIAS, A. S. et al. The effect of treatment with crotapotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 299-305, 2007.

CATTANEO, F., GUERRA, G. et al. Expression and signaling of formyl-peptide receptors in the brain. **Neurochem Res**, v. 35, n. 12, p. 2018-2026, 2010.

CHIANG, N., SERHAN, C. N. et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. **Pharmacol Ver**, v. 58, n. 3, p. 463-487, 2006.

CHOUMET, V., BOUCHIER, C. et al. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A2 from the venom of a South-American rattlesnake. **Adv Exp Med Biol**, v. 391, p. 197-202, 1996.

CROZE, E., YAMAGUCHI, K. D. et al. Interferon-beta-1b-induced short- and long-term signatures of treatment activity in multiple sclerosis. **Pharmacogenomics J**, 2012.

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

CURA, J. E., BLANZACO, D. P. et al. Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA2, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer. **Clinical Cancer Reserc**, v. 8, n. 4, p. 1033-1041, 2002.

CURY, Y. AND PICOLO, G. Animal toxins as analgesics--an overview. **Drug News Perspect**, v. 19, n. 7, p. 381-392, 2006.

DAS, U. N. Is multiple sclerosis a proresolution deficiency disorder? **Nutrition**, v. 28, n. 10, p. 951-958, 2012.

DELOT, E. AND BON, C. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry**, v. 32, n. 40, p. 10708-10713, 1993.

DUFTON, N. AND PERRETTI, M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacol Ther**, v. 127, n. 2, p. 175-188, 2010.

DUNHAM, N. W. AND MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)**, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

DWORKIN, R. H., BACKONJA, M. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v. 60, n. 11, p.1524-1534, 2003.

EHDE, D. M., OSBORNE, T. L. et al. The scope and nature of pain in persons with multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 12, n. 5, p. 629-638, 2006.

EHDE, D. M., OSBORNE, T. L. et al. Chronic Pain in Persons with Multiple Sclerosis. **Phys med rehab cli North America**, v. 16, n. 2, p. 503-512, 2005.

EIKELENBOOM, M. J., KILLESTEIN, J. et al. Gender differences in multiple sclerosis: Cytokines and vitamin D. **J Neurol Sci**, v. 286, n. 1, p. 40-42, 2009.

EL-BEHI, M., ROSTAMI, A. et al. Current Views on the Roles of Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J Neuroimmune Pharma**, v. 5, n. 2, p. 189-197, 2010.

ESIRI, M. M. Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. **Lancet** v. 2, n. 8036, p. 478, 1977.

FAIAD, O. J., DELLA-CASA, M. S., SAMPAIO, S. C. Lipoxin A4 contributes to inhibitory effect of Crotoxin on growth of Walker 256 tumor. **In X Annual Scientific Meeting**, v. 65 n. 8, p. 4, 2008.

FAURE, G. AND BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, n. 2, p. 229-234, 1987.

FINNERUP, N. B., GOTTRUP, H. et al. Anticonvulsants in central pain. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 3, n. 10, p. 1411-1420, 2002.

FINNERUP, N. B., OTTO, M. et al. Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence based proposal. **Pain**, v. 118, n. 3, p. 289-305, 2005.

FLÜGEL, A., BERKOWICZ, T. et al. Migratory Activity and Functional Changes of Green Fluorescent Effector Cells before and during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Immunity**, v. 14, n. 5, p. 547-560, 2001.

GARCIA, F., TOYAMA, M. H. et al. Crotafolin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 433-437, 2003.

- GASPERINI, C. AND RUGGIERI, S. Development of oral agent in the treatment of multiple sclerosis: how the first available oral therapy, fingolimod will change therapeutic paradigm approach. **Drug Des Devel Ther**, v. 6, p. 175-186, 2012.
- GENAIN, C. P., CANNELLA, B. et al. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. **Nat Med**, v. 5, n. 2, p. 170-175, 1999.
- GOLDENBERG, P. Z., KWON, E. E. et al. Opsonization of normal myelin by anti-myelin antibodies and normal serum. **J Neuroimmunol**, v. 23, n. 2, p. 157-166, 1989.
- GOPALAKRISHNAKONE, P., DEMPSTER, D. W. et al. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 85-98, 1984.
- HAO, J., CAMPAGNOLO, D. et al. Interleukin-2/interleukin-2 antibody therapy induces target organ natural killer cells that inhibit central nervous system inflammation. **Ann Neurol**, v. 69, n. 4, p. 721-734, 2011.
- HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1123-1132, 2005.
- HEMMER, B., CEPOK, S. et al. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. **Curr Opin Neurol**, v. 15, n. 3, p. 227-231, 2002.
- HIRSH, A. T., TURNER, A. P. et al. Prevalence and Impact of Pain in Multiple Sclerosis: Physical and Psychologic Contributors. **Arch Phys Med Rehab**, v. 90, n. 4, p. 646-651, 2009.
- HOFSTETTER, H. H., IBRAHIM, S. M. et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cellular Immunology**, v. 237, n. 2, p. 123-130, 2005.
- HOLMOY, T., VANDVIK, B. et al. T cells from multiple sclerosis patients recognize immunoglobulin G from cerebrospinal fluid. **Mult Scler**, v. 9, n. 3, p. 228-234, 2003.
- HUAN, J., CULBERTSON, N. et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 1, p. 45-52, 2005.
- INOUE, K. AND TSUDA, M. Microglia and neuropathic pain. **Glia**, v. 57, n. 14, p. 1469-1479, 2009.
- IVANOV, II, MCKENZIE, B. S. et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.
- IWAKURA, Y. AND ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **J Clin Invest**, v. 116, n. 5, p. 1218-1222, 2006.

JADIDI-NIARAGH, F. AND MIRSHAFIEY, A. Th17 Cell, the New Player of Neuroinflammatory Process in Multiple Sclerosis. **Scandinavian J Immunology**, v. 74, n. 1, p. 1-13, 2011.

KABAT, E. A., BAER, H. et al. Immunochemical Studies on Blood Groups : Xi. Species Differences among Blood Group a Substances. **J Exp Med**, v. 91, n. 4, p. 433-445, 1950.

KOOI, E. J., PRINS, M. et al. Cholinergic imbalance in the multiple sclerosis hippocampus. **Acta Neuropathol**, v. 122, n. 3, p. 313-322, 2011.

LANDUCCI, E. C., ANTUNES, E. et al. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.

LASSMANN, H., RAINE, C. S. et al. Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. **J Neuroimmunol**, v. 86, n. 2, p. 213-217, 1998.

LEUSSINK, V. I., HUSSEINI, L. et al. Symptomatic therapy in multiple sclerosis: the role of cannabinoids in treating spasticity. **Ther Adv Neurol Disord**, v. 5, n. 5, p. 255-266, 2012.

LEWIS, R. J. AND GARCIA M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LISI, L., NAVARRA, P. et al. Rapamycin reduces clinical signs and neuropathic pain in a chronic model of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, v. 243, n. 1-2, p. 43-51, 2012.

LOCK, C., HERMANS, G. et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. **Nat Med**, v. 8, n. 5, p. 500-508, 2002.

LOU, Y. H., PARK, K. K. et al. Retargeting T cell-mediated inflammation: a new perspective on autoantibody action. **J Immunol**, v. 164, n. 10, p. 5251-5257, 2000.

LUCCHINETTI, C., BRUCK, W. et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. **Ann Neurol**, v. 47, n. 6, p. 707-717, 2000.

MARTIN, R., MCFARLAND, H. F. et al. Immunological aspects of demyelinating diseases. **Annu Rev Immunol**, v. 10, p. 153-187, 1992.

MATTSON, D. H., ROOS, R. P. et al. Isoelectric focusing of IgG eluted from multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis brains. **Nature**, v. 287, n. 5780, p. 335-337, 1980.

MATUSEVICIUS, D., KIVISÄKK, P. et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 5, n. 2, p. 101-104, 1999.

MEAD, R. J., SINGHRAO, S. K. et al. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. **J Immunol**, v. 168, n. 1, p. 458-465, 2002.

MENDEL, I., KERLERO DE ROSBO, N. et al. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 7, p. 1951-1959, 1995.

MEUTH, S. G., GOBEL, K. et al. Immune therapy of multiple sclerosis - future tegies. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 29, p. 4489-4497, 2012.

MILLER, A. E. AND RHOADES, R. W. Treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: current approaches and unmet needs. **Curr Opin Neurol**, v. 25, p. S4-10, 2012.

MILLIGAN, E. D. AND WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009.

MUNSCHAUER, F. E., HARTRICH, L. A. et al. Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. **J Neuroimmunol**, v. 62, n. 2, p.177-181, 1995.

NICHOLAS, R. AND RASHID, W. Multiple sclerosis. **Clin Evid (Online)**, 2012.

NICK, S. T., ROBERTS, C. et al. Multiple sclerosis and pain. **Neurol Res**, 2012.

NOGUEIRA-NETO, F. D. S., AMORIM, R. L. et al. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. **Pharma Bioch Behav**, v. 91, n. 2, p, 252-260, 2008.

NUNES, F. P. B., ZYCHAR, B. C. et al. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1100-1106, 2010.

O'CONNOR, A. B., SCHWID, S. R. et al. Pain associated with multiple sclerosis: Systematic review and proposed classification. **Pain**, v. 137, n. 1, p. 96-111, 2008.

OKAMOTO, M., VISKATIS, L. J. et al. Induction of tolerance to crotoxin in mice. **J Pharm Exp Therap**, v. 265, n. 1, p. 41-46, 1993.

OLECHOWSKI, C. J., PARMAR, A. et al. A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Pain**, v. 149, n. 3, p. 565-572, 2009.

- OSBORNE, T. L., JENSEN, M. P. et al. Psychosocial factors associated with pain intensity, pain-related interference, and psychological functioning in persons with multiple sclerosis and pain. **Pain**, v. 127, n. 1-2, p. 52-62, 2007.
- PETZOLD, A., EIKELENBOOM, M. J. et al. Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. **Brain**, v. 125, n. 7, p. 1462-1473, 2002.
- PITT, D., WERNER, P. et al. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. **Nat Med**, v. 6, n. 1, p. 67-70, 2000.
- PITTOCK, S. J. AND LUCCHINETTI, C. F. The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. **Neurologist**, v. 13, n. 2, p. 45-56, 2007.
- RANGEL-SANTOS, A., LIMA, C. et al. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 609-616, 2004.
- RODRIGUES, D. H., SACHS, D. et al. Mechanical hypernociception in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 67, n. 1, p. 78-81, 2009.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, Pathology and Treatment of snakes bites in South America. **Venomous Animals and Their Venoms**, Bücherl, W and Buckley, E. New York: In: A. Press (Ed.), 1971.
- SAMPAIO, S. C., BRIGATTE, P. et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 899-907, 2003.
- SAMPAIO, S. C., HYSLOP, S. et al. Crotoxin: Novel activities for a classic [beta]-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.
- SAMPAIO, S. C., SANTOS, M. F. et al. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 909-919, 2006.
- SCARR, E. Muscarinic receptors: their roles in disorders of the central nervous system and potential as therapeutic targets. **CNS Neurosci Ther**, v. 18, n. 5, p. 369-379, 2012.
- SEAMONS, A., PERCHELLET, A. et al. Immune tolerance to myelin proteins. **Immunologic Research**, v. 28, n. 3, p. 201-221, 2003.
- SLAVIN, A., KELLY-MODIS, L. et al. Pathogenic mechanisms and experimental models of multiple sclerosis. **Autoimmunity**, v. 43, n. 7, p. 504-513, 2010.
- SLOANE, E., LEDEBOER, A. et al. Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental Multiple Sclerosis: MOG-EAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine gene therapy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 1, p. 92-100, 2009.

SNEDECOR, G. W. AND HABER, E. S. Statistical methods for an incomplete experiment on a perennial crop. **Biometrics**, v. 2, n. 4, p. 61-67, 1946.

SOARES, A. M., MANCIN, A. C. et al. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 33, n. 9, p. 877-888, 2001.

SOSPEDRA, M. AND MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 683-747, 2005.

SVENSSON, C. I., ZATTONI, M. et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. **J Exp Med**, v. 204, n. 2, p. 245-252, 2007.

SZCZUCINSKI, A. AND LOSY, J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. **Acta Neurol Scand**, v. 115, n. 3, p. 137-146, 2007.

THIBAUT, K., CALVINO, B. et al. Characterisation of sensory abnormalities observed in an animal model of multiple sclerosis: a behavioural and pharmacological study. **Eur J Pain**, v. 15, n. 3, p. 231-216, 2011.

TINTORÉ, M. AND ARRAMBIDE, G. Early onset multiple sclerosis: The role of gender. **J Neurol Sci**, v. 286, n. 1-2, p. 31-34.

TRAPP, B. D., PETERSON, J. et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 338, n. 5, p. 278-285, 1998.

TROTTER, J., DEJONG, L. J. et al. Opsonization with antimyelin antibody increases the uptake and intracellular metabolism of myelin in inflammatory macrophages. **J Neurochem**, v. 47, n. 3, p. 779-789, 1986.

TUBARO, A., PUCCINI, F. et al. The treatment of lower urinary tract symptoms in patients with multiple sclerosis: a systematic review. **Curr Urol Rep**, v. 13, n. 5, p. 335-342, 2012.

VAN DER LAAN, L. J., SR, R. et al. Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: Phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor- α and nitric oxide. **J. Neuroimmunol**, v. 70, p. 145-152, 1996.

VIVIANI, B., BARTESAGHI, S. et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **J Neurosci**, v. 23, n. 25, p. 8692-8700.

WESS, J., DUTTAROY, A. et al. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review. **Life Sci**, v. 72, n. 18-19, p. 2047-2054, 2003.

YUAN, S., SHI, Y. et al. Wnt Signaling in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis-Associated Chronic Pain. **J Neuroimmune Pharmacol**, 2012.

ZAMBELLI, V. O., SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357-1367, 2008.

ZHANG, H.-L., HAN, R. et al. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from crotalus durissus terrificus venom. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 175-182, 2006.

ZHU, Q., WU, D.C. et al. Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 102-111, 2008.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.