

EVILIN NANAME KOMEAE

**Efeito imunomodulatório do *Tnp*,
um peptídeo isolado do veneno de *Thalassophryne nattereri*
na encefalomielite autoimune experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Carla Lima da Silva

Co-Orientadora: Dra. Mônica Lopes-Ferreira

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

KOMEGAE, E. N. **Efeito imunomodulatório do *Tnp*, um peptídeo isolado do veneno de *Thalassophryne nattereri* na encefalomielite autoimune experimental.** 2013. 86 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Diante da ausência de tratamentos eficazes para a esclerose múltipla (EM) e sabendo que peptídeos derivados de venenos animais têm sido usados como protótipos farmacológicos para o desenvolvimento de novas drogas avaliamos o efeito do *Tnp*, um peptídeo cíclico inédito e com potencial antiinflamatório derivado do veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri*, na encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo representativo da EM. Avaliamos também a participação da citocina IL-10 na modulação dos efeitos do *Tnp*. Para isto, induzimos a EAE ativamente em camundongos C57BL/6 fêmeas *WT* ou IL-10 *KO* pela imunização com o MOG₃₅₋₅₅, um peptídeo imunodominante da mielina. Demonstramos que a aplicação subcutânea do *Tnp* (3 mg/Kg) em vários esquemas de tratamento: profilático (0-9 dias), terapêutico (10-19 dias) ou contínuo (0-19 dias) consegue diminuir a intensidade dos sintomas clínicos e adiar o pico de aparecimento dos sintomas graves por mecanismos também dependentes de IL-10. O uso de histologia, zimografia e citometria de fluxo, nos permitiu observar que o *Tnp* beneficemente interfere no circuito imunológico da EAE em vários estágios: 1) suprime o estado de ativação das células dendríticas convencionais (cDC) e propicia a emergência de DC plasmocitóides durante a fase de indução da EAE; 2) bloqueia o trânsito e a infiltração de leucócitos para o SNC pela inibição de integrinas e MMP; 3) bloqueia a reativação e a permanência de clones Th1 e Th17 patogênicos no SNC; 4) impede a expansão de células da microglia e o infiltrado de macrófagos no SNC; 5) favorece o aumento de células reguladoras (Treg e Breg) e ainda 6) difunde-se sistemicamente e ultrapassa a BHE e alcançar o órgão alvo. O resultado dos efeitos conjuntos do *Tnp* é a atenuação da neuroinflamação e a prevenção da desmielinização, refletindo assim na melhoria dos sinais clínicos na EAE. Em conclusão, o tratamento com o *Tnp*, não apenas apresenta efeitos supressores no curso da EAE, mas também apresenta propriedades preventivas, uma vez que tal composto atrasa significativamente o início da doença.

Apoio: FAPESP e CNPq.

Palavras-chave: EAE. Doença Autoimune. *Tnp*. Peptídeos Cíclicos. Veneno de *Thalassophryne nattereri*. Imunomodulação.

ABSTRACT

KOMEGAE, E. N. **Immunomodulatory effect of the *Tnp*, a peptide isolated from the venom *Thalassophryne nattereri* on experimental autoimmune encephalomyelitis.** 2013. 86 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Given the lack of effective treatments for multiple sclerosis (MS) and knowing that peptides from venomous have been extensively used as pharmacological prototype for the development of new drugs here we evaluated the effect of the *Tnp*, a described antiinflammatory cyclic peptide identified in the venom of *Thalassophryne nattereri* Brazilian fish, on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a representative model of MS. As well, we evaluated whether IL-10 is required for the suppressive mechanisms of the *Tnp*. In female C57BL/6 *WT* and IL-10 *KO* mouse model of EAE induced by sensitization to MOG₃₅₋₅₅ peptide, we found that prophylactic (0-9 days), therapeutic (10-19 days) or continuous (0-19 days) s.c. injections of *Tnp* (3 mg/kg/day) significantly reduced the clinical severity of EAE. The analyses by histology, zymography or flow cytometry allowed us to observe that modulation of EAE by *Tnp* was related with: 1) suppression of the activation state of conventional dendritic cells (DC) and the emergence of plasmacytoid DC during the induction phase of EAE; 2) blocking the traffic and leukocyte infiltration in the central nervous system (CNS) by suppression of metalloproteinases (MMP-9) activity and synthesis; 3) blocking of the reactivation and retention of Th1 and Th17 pathogenic clones in the CNS; 4) prevention the growth of microglia cells and the infiltrate of macrophages in the CNS; 5) increasing of regulatory cells (Treg and Breg) in the secondary lymphoid organs and in the CNS, and also 6) *Tnp* can overcome the blood-brain barrier and reach the target organ. In conclusion, *Tnp* can reduce the severity of symptoms and delay the peak of onset of severe symptoms by mechanisms dependent on IL-10. These results shed light on the role of *Tnp* a small molecule in the regulation of inflammation and provides a new therapeutic opportunity for the treatment of MS.

Support by: Fapesp and CNPq.

Keywords: EAE. Autoimmune Disease. Cyclic peptide. *Thalassophryne nattereri* Venom. Immunomodulator.

INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma das doenças mais comuns do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por desmielinização e disfunção neurológica progressiva (RUNIA et al., 2012). A EM tem sido cada vez mais estudada, tanto na pesquisa básica como na clínica por ser uma doença debilitante, altamente complexa e pela elevada incidência. Atualmente, de acordo com a Federação Internacional de Esclerose Múltipla estima-se 2.1 milhões de pessoas com esclerose múltipla no mundo (<http://www.msif.org/pt/>). No Brasil, sua taxa de prevalência é de aproximadamente 10 casos para cada 100.000 habitantes de acordo com o Ministério da Saúde (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_esclerose_multipla.pdf).

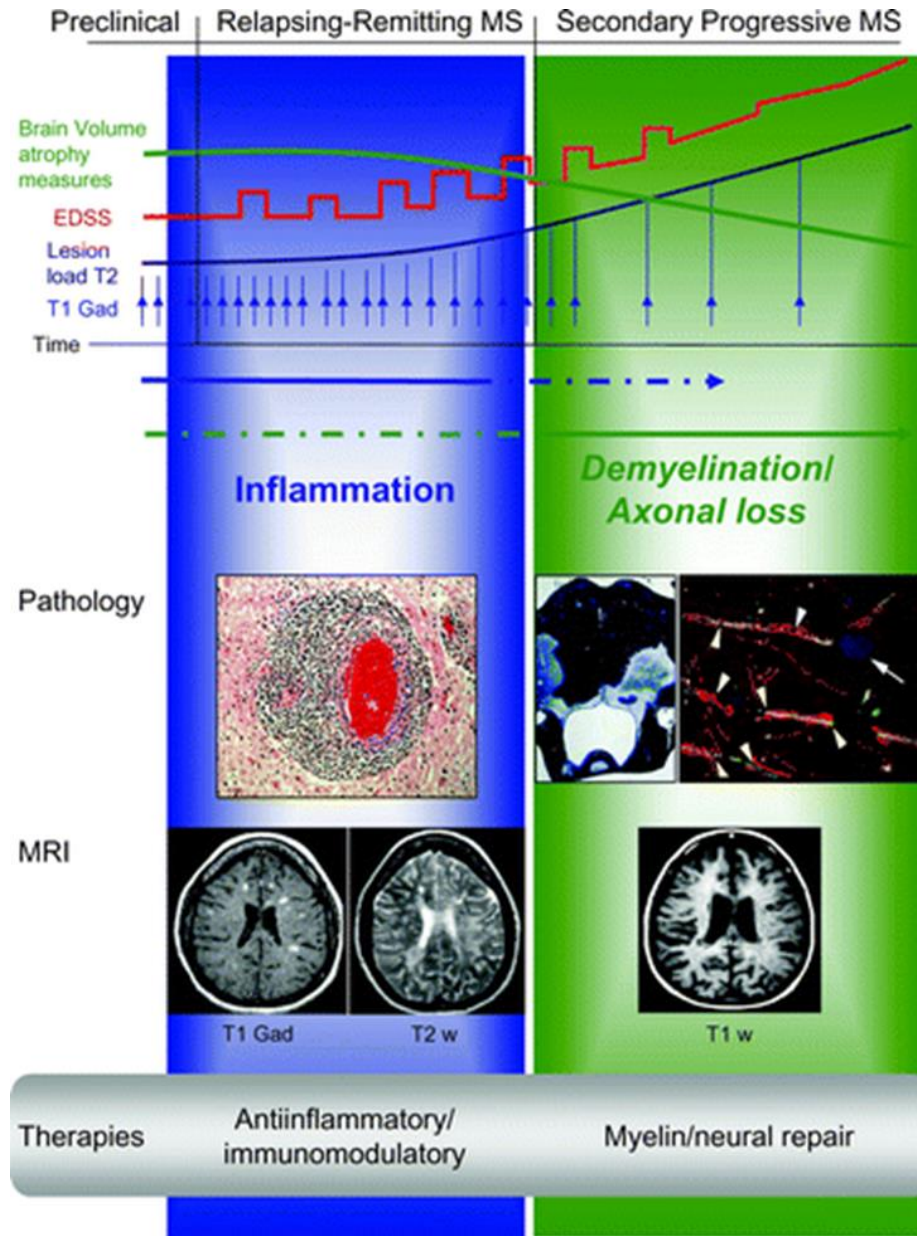
A real etiologia da EM ainda é desconhecida, mas muitos estudos indicam a importância do sistema imune na patogênese da doença, influenciada por ambos os fatores genéticos e ambientais (MCELROY; OKSENBERG, 2008). Estudos genéticos e familiares revelam que os alelos HLA-DR1501 e HLA-DQ0601 estão associados com 2 a 4 vezes mais risco de desenvolvimento da EM (EBERS et al., 1995; OLERUP; HILLERT, 1991; SADOVNICK et al., 1996), além da alta prevalência em algumas etnias (particularmente em pessoas do Norte Europeu) (CORADDU, 1998). No entanto, a associação entre as recaídas e infecções virais apoia fortemente o papel de fatores ambientais no desenvolvimento da EM (ADAM et al., 2010; BULJEVAC et al., 2002).

A doença geralmente começa na idade adulta e afeta principalmente as mulheres. Afeta usualmente adultos na faixa de 18 a 55 anos, mas casos fora destes limites têm ocorrido. Os sinais clínicos variam muito e apesar de cada indivíduo apresentar uma combinação diferente de sintomas que incluem ataxia, perda da coordenação motora, hiperreflexia, fadiga, dificuldades cognitivas e de visão, há certos padrões distintos de sintomas que permitem classificações durante a evolução da doença. O diagnóstico é baseado nos Critérios revisados por McDonald (POLMAN et al., 2005), sendo o diagnóstico diferencial bastante amplo e complexo. Estes critérios são os adotados pela comunidade científica mundial para o diagnóstico de esclerose múltipla e a ressonância magnética (RM) do encéfalo demonstrará lesões características de desmielinização (apenas 1 ou 2 lesões sugestivas de EM na RM). Devem ser realizados alguns exames laboratoriais (exames de anti-HIV e VDRL e dosagem sérica de vitamina B12) no sentido de excluir outras doenças de apresentação semelhante à EM. Deficiência de vitamina B12, neurolues ou infecção pelo HIV (o vírus HIV pode causar uma encefalopatia com imagens à RM semelhantes às que ocorrem na EM) apresentam quadros radiológicos semelhantes aos de EM, em alguns casos.

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil há quatro formas de evolução clínica na esclerose múltipla: remitente-recorrente (EM-RR) caracterizada por períodos claramente definidos

de comprometimento das função neurológica (surto), seguida por períodos de recuperação parcial ou completa (remissões), primariamente progressiva (EM-PP), primariamente progressiva com surto (EM-PP com surto) e secundariamente progressiva (EM-SP). A forma mais comum é a EM-RR, representando 85% de todos os casos no início de sua apresentação. A forma EM-SP é uma evolução natural da forma EM-RR em 50% dos casos após 10 anos do diagnóstico (em casos sem tratamento – história natural). As formas EM-PP e EM-PP com surto perfazem 10% a 15 % de todos os casos (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_esclerose_multipla.pdf).

Figura 1 - Representação esquemática da evolução clínica da EM.



A escala clínica da EM é indicada pela *linha vermelha*. A frequência de eventos inflamatórios é indicada pelas *setas azuis*; o dano tecidual pela *linha azul* e atrofia cerebral pela *linha verde*. Alterações patológicas podem ser observadas na foto à esquerda, onde há uma intensa inflamação perivascular de células mononucleares. À direita, observamos áreas de desmielinização (em azul e branco) e perda de mielina nas conexões axonais (*em verde*). Por Imagem de ressonância magnética: Em T1-Gad (contraste), as lesões brancas indicam áreas de inflamação recente e ruptura da barreira hemato-encefálica (BHE). Em T2 observamos em branco os ventrículos cheio de fluídos cérebro espinhal e lesões no parênquima cerebral. Em T1w observamos uma atrofia cerebral, com ventrículos laterais largos e sulcos corticais.

Fonte: Adaptado de Sospedra e Martin (2005).

O papel do sistema imunológico na patogênese da EM foi proposto desde as observações iniciais de desmielinização aguda em humanos após a imunização acidental com componentes da mielina (por exemplo, após a vacinação contra o vírus da raiva que eram cultivados sobre oligodendrócitos) (REMLINGER, 1928) os quais apresentavam paralisias semelhantes à EM e desde então, vários grupos têm demonstrado e comprovado a importância dos componentes do sistema imune na patogenia da EM (HAFLER et al., 2005; HEMMER et al., 2002; MILLER, 2012; ZHANG et al., 1992). A EM é autoimune, degenerativa e dependente de diferentes clones auto-reativos de linfócitos T CD8 positivos, restritos à molécula MHC de classe I que reconhecem diversos epítomos de mielina, presentes na circulação e no fluido cérebro-espinhal. Observa-se também infiltrado de macrófagos da circulação e infiltração tardia de linfócitos T CD4 positivos e linfócitos B produtores de anticorpos com formação de centro germinativo na região submeningeal. Ainda ocorre a formação de agregados de células inflamatórias semelhantes a folículos linfóides nas meninges e no espaço perivascular.

O modelo animal de EM denominado encefalomielite autoimune experimental (EAE) foi estabelecido há 80 anos por Rivers e colaboradores (RIVERS et al., 1933). Devido à inacessibilidade do SNC dos pacientes e a similaridade do modelo quanto à patogênese de autoimunidade, inflamação do SNC, desmielinização e sintomas (BAXTER, 2007; SOSPEDRA; MARTIN, 2005), atualmente o modelo de EAE é responsável por cerca de 9.300 trabalhos publicados no *PubMed* e vem se mostrando importante para o estudo de diversas substâncias antiinflamatórias permitindo a translação dos resultados para humanos (ELLOSO et al., 2005; GREENWOOD et al., 2006; THEIL et al., 2009). A EAE é mais comumente induzida em camundongos, mas pode também ser induzida em outras espécies como ratos, coelhos e macacos. A indução ativa em animais susceptíveis pela imunização com antígenos derivados da mielina adsorvidos em adjuvante é a forma mais comum, entretanto a indução passiva pela transferência adotiva de linfócitos T CD4^{pos} reativas à mielina também vem sendo amplamente utilizada (BAXTER, 2007).

Na EAE induzida ativamente, após a quebra da tolerância imune, o ataque do SNC por células imunes pode ser dividido em 2 fases: a **Fase indutora**, que ocorre nos órgãos linfóides secundários (entre os dias 0 a 9), onde as células apresentadoras de antígenos (APC) em pleno estado de maturação (expressão elevada das moléculas de MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86) levam os epítomos de mielina e ativam os linfócitos T CD4^{pos}, que sofrem expansão clonal e diferenciação em clones Th1 produtores de IFN- γ (KUCHROO et al., 2002) e clones Th17 secretores de IL-17A, IL-17F e IL-21 (HARRINGTON et al., 2005). A segunda fase da doença denominada **Fase efetora** (entre os dias 10 a 19, com pico no 17) se inicia quando os linfócitos T auto-reativos saem dos órgãos linfóides, atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e migram para o parênquima e o espaço perivascular

do SNC, seguido pelo influxo de macrófagos, mecanismos estes dependentes de moléculas de adesão (ARCHELOS et al., 1999; ENGELHARDT et al., 1998 e 2003), quimiocinas (HUANG et al., 2001) e metaloproteinases de matriz (MMP - HU et al., 2007; PAGE-MCCAW et al., 2007).

Dentro do SNC, os linfócitos T são reativados por células residentes (astrócitos e microglia) e por células dendríticas (DC) e macrófagos infiltrantes, amplificando a liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, radicais livres, intermediários reativos de oxigênio, óxido nítrico, MMP e citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (BENVENISTE, 1997; DITTEL et al., 2008). Esta neuroinflamação, bem como a ativação de células T citotóxicas resulta na perda da mielina e, conseqüentemente, na degeneração axonal e morte neuronal que refletem em paralisia, típica dos sintomas da EM.

No curso da resposta inflamatória da EAE vem sendo descrita a geração de várias proteases intracelulares ou extracelulares. As proteases são cruciais para a regulação de mecanismos imunológicos, tais como apresentação de antígeno, a migração de células imunitárias e inflamatórias e de ativação (PUENTE et al., 2003). A família de proteases é dividida em quatro sub-categorias principais baseado na interação do resíduo catalítico das proteases com inibidores específicos: a) serino-proteases, b) metaloproteases, c) proteases aspárticas e d) cisteíno-proteases. Neste sentido, o uso de inibidores de proteases têm sido promissor na terapêutica da EM (DAI et al., 2012).

Embora a indução da EM inclua condições para a quebra da tolerância a antígenos próprios, o sistema imune lança mão de inúmeros mecanismos para evitar que fenômenos autoimunes aconteçam e que resultem em efeitos deletérios para o organismo. Neste sentido, o favorecimento da geração e manutenção de algumas células e citocinas se destacam, dentre elas: as DC plasmocitóides (pDC) (ISAKSSON, et al., 2009; PENA-CRUZ et al., 2010), as células T reguladoras (Treg) e células B reguladoras (Breg), bem como as citocinas IL-10, TGF- β , e mais recentemente descrita a IL-35. Uma vez que defeitos nestes componentes regulatórios invariavelmente resultam em doenças autoimunes e inflamatórias (MAHNKE et al., 2003) na EAE não é diferente, o papel das pDC (CD11c^{low}B220^{pos}Gr-1^{pos}PDL-1^{pos}PDL-2^{pos}) têm sido relacionado a proteção principalmente durante a fase tardia da doença (PENA-CRUZ et al., 2010). A importância das células Treg (CD4^{pos}CD25^{pos}FoxP3^{pos}) na EM tem sido confirmada, uma vez que defeitos neste subtipo celular podem ser uma das causas do desenvolvimento da autoimunidade. Ademais, existe uma correlação positiva entre a presença de IL-10 produzida por células Treg no SNC e a recuperação da doença (MCGEACHY et al., 2005), bem como a expressão de CTLA-4 (SAKAGUCHI et al., 2006). Células Breg (CD19^{pos}CD5^{pos}CD1d^{pos}) produtoras de IL-10, também estão relacionadas ao controle da EAE, uma vez que a transferência adotiva destas células atenua a doença. Recentes dados mostram que a depleção transiente de células B influencia potencialmente a indução, manutenção e reativação de linfócitos T

CD4^{pos} (LUND; RANDALL, 2010) além de também terem sido relatadas facilitar o recrutamento de células Treg para o SNC durante a fase crônica da EAE (MANN et al., 2007), mostrando assim o papel duplo que os linfócitos B desempenham na EAE.

O papel das citocinas como importantes elementos regulatórios nos processos imunes está bem estabelecido (ENG et al., 1996). A IL-10 foi primeiramente descrita como um fator produzido por células Th2, com papel na inibição da síntese de citocinas pelas células Th1 (FIORENTINO et al., 1991) por interferir na apresentação antigênica mediado pelas APC (DE WAAL MALEFYT et al., 1991). Atualmente, sabe-se que a IL-10 é secretada por diversos tipos celulares (Th1, Breg, Treg, DC, macrófagos, células endoteliais) e que sua ação também é ampla, uma vez que inúmeras células expressam os receptores IL-10R1 e IL-10R2.

A IL-10, portanto é uma das principais citocinas reguladoras e juntamente com o TGF- β e a IL-35 apresentam papéis essenciais na prevenção e no controle de doenças autoimunes (BETTELLI et al., 1998; BELKAID; CHEN, 2010; CHEN et al., 2009; COLLISON et al., 2010). As ações supressoras destas citocinas têm sido extensivamente estudadas em modelos animais que superexpressam ou que são deficientes destas citocinas, e os resultados mostram que a superexpressão de IL-10, por exemplo, é protetora no desenvolvimento da EAE, bem como os animais IL-10 *Knockout* (KO) apresentam uma doença exacerbada (BETTELLI et al., 1998; KENNEDY et al., 1992; SAMOILOVA et al., 1998). Similarmente, uma menor produção de IL-10 em humanos é relacionada como um fator de risco para o desenvolvimento e para a patogênese da EM (VANDENBARK et al., 2001). Sendo assim, a IL-10 tem um importante papel na supressão da doença em camundongos e em humanos.

Ao longo dos últimos anos, vários agentes terapêuticos para o tratamento da EM têm sido testados e estudados, mas a gestão da doença ainda permanece complexa e pouco confiável. Quanto à falha terapêutica, considera-se esta como sendo dois ou mais surtos num período de 12 meses, de caráter moderado ou grave com sequelas ou limitações significantes, pouco responsivos à pulsoterapia.

Com base na natureza inflamatória da doença, a imunossupressão global foi a primeira abordagem para a atenuação dos efeitos das células imunes auto-reativas no SNC. Em alguns estudos iniciais, o tratamento com a *Ciclosporina* (um polipeptídeo cíclico que contém 11 aminoácidos) demonstrou alguns efeitos secundários benéficos na EM. Além disso, a *Mitoxantrona* - Novantrone (pertencente à família das antracenedionas sintéticas) também tem sido utilizada para o tratamento das formas mais graves da doença, corroborando assim para o atraso na progressão da incapacidade de alguns pacientes com EM (HARTUNG et al., 2002).

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde no Brasil é apenas para as formas recorrentes-remittente e secundariamente progressiva, pois não há evidências de benefício para as demais. O tratamento inicial deve ser feito com uma das opções dentre o *Acetato de glatiramer* (de 7.000 Da, GA) e as drogas recombinantes derivadas do *Interferon-β* (IFN-β1a e IFN-β1b - Avonex e Rebif de 22.000 Da, Betaferon de 18.000 Da) que são igualmente eficazes no controle das recidivas, mesmo que apresentem um efeito modesto na redução dos surtos (em torno de 30%) e no retardo de deficiências na remissão dos pacientes (JACOBS et al., 1996; JOHNSON et al., 1995).

Os mecanismos sugeridos para o IFN-β no controle da EM são: limitação do tráfico de células T para o SNC, a restauração do balanço Th1-Th2 pela indução da produção de IL-10, e a indução de propriedades antivirais (YONG, 2002). Vale ressaltar que a maioria das drogas utilizadas na clínica para o tratamento da EM, inclusive os da classe de *Interferons-β* que representa a principal droga, requer a participação da citocina IL-10 para mediação do controle da evolução da doença (Ersoy et al., 2005).

Por outro lado, o mecanismo inibitório do GA parece ser causado pela geração de células Th2 reativas à mielina que atravessam a BHE e suprimem as lesões no SNC pela alteração no padrão de citocinas (NEUHAUS et al., 2001). No entanto, nenhum estudo foi capaz de demonstrar um benefício significativo na supressão da progressão da doença, pois nem todos os pacientes respondem ao IFN-β e um número substancial de pacientes que inicialmente respondem acaba apresentando uma redução na eficácia do tratamento durante o curso da doença. Isto tem sido atribuído à geração de uma resposta de anticorpos neutralizantes contra o IFN-β (HEMMER et al., 2005).

Diante destes dados que mostram a baixa eficácia no controle das recidivas da EM modesta redução dos surtos (em torno de 30%), fica claro a existência de uma grande oportunidade de pesquisas inovadoras nesta área. Neste sentido, novos compostos imunomoduladores que melhoram a EAE têm se mostrado uma promessa para o tratamento da EM. As *Estatinas* e a *Minociclina* que exercem uma variedade de ações imunomoduladoras foram avaliadas em testes pré-clínicos e clínicos (METZ et al., 2004; VOLLMER et al., 2004). Terapia com células-tronco hematopoiéticas para formação de um novo repertório de células T também produziu resultados promissores, porem acompanhados de elevada mortalidade (BURT et al., 2005).

A deleção específica de populações celulares distintas, o bloqueio seletivo ou a ativação de células e moléculas reguladoras têm também sido de grande interesse para o tratamento da EM. Anticorpos monoclonais têm sido amplamente utilizados contra moléculas de superfície de células específicas. A depleção de linfócitos T CD4^{pos} mostrou resultados promissores em modelos animais, mas não teve nenhum impacto na EM (VAN OOSTEN et al., 1996). Por outro lado, a depleção de

células B pelo uso de anti-CD20 parece ser benéfica em grupos de pacientes com atividade humoral exacerbada (STUVE et al., 2005).

Com base nos resultados positivos em EAE, anticorpos contra o fator de crescimento IL-2 para células T e terapias com anti-TNF- α foram testados em ensaios de fase II, mas também não mostraram efeito promissor em pacientes com EM (BIELEKOVA et al., 2004). Além disso, vários tratamentos têm sido desenvolvidos especificamente para linfócitos T reativos à mielina. Estas estratégias incluem a tolerização de células T auto-reativas por administração oral de antígenos de mielina ou pela administração de peptídeos da mielina alterados. Apesar dos resultados promissores em modelos experimentais, os testes clínicos já em fase III falharam (HOHLFELD; WIENDL, 2001). O bloqueio de moléculas de adesão com a utilização de anticorpos contra a integrina β 4, a fim de evitar que as células imunes atravessem a BHE também mostrou resultados positivos na EAE. Este tratamento (anti-VLA-4, *Natalizumab*) suprime eficazmente a progressão da doença em humanos, porém apresenta muitos efeitos colaterais (ADELMAN et al., 2005). O *Fingolimod*, um composto derivado da miriocina (ISP-1) um metabólito do fungo *Isaria sinclairii*, aprovado pelo FDA em 2010 para o tratamento da EM surto/remissiva apresenta mecanismos supressivos na migração de células imunes via ação em receptores esfingosina-1 fosfato, entretanto em abril de 2012 seu uso foi revisto pela elevada incidência de problemas cardíacos e sua indicação ficou restrita a acompanhamento dos efeitos da aplicação em unidade hospitalar durante a aplicação da primeira dose.

Apesar do número crescente de abordagens terapêuticas disponíveis, fica claro que nenhuma das terapias existentes consegue interromper eficazmente a progressão da doença em pacientes com EM. Portanto, existe uma grande abertura para a continuada busca de terapias mais eficazes, novas alternativas e novos compostos. Baseado no fato de que toxinas e peptídeos isolados de venenos animais têm sido cada vez mais usados como ferramentas farmacológicas e como protótipos para o desenvolvimento de novas drogas em diferentes modelos experimentais de doenças (KALMAN et al., 1998; LEWIS; GARCIA, 2003; SUAREZ-KURTZ et al., 1999) o nosso grupo coordenado pela Dra. Mônica Lopes Ferreira e pela Dra. Carla Lima em associação com o Laboratório Farmacêutico Cristália identificou e patenteou (INPI0602885-3, EP2046815, US8304382, MX300187) um peptídeo inédito com potencial antiinflamatório denominado *Tnp*, derivado do veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri*. Este peptídeo, compreende uma sequência de 13 L-aminoácidos em sua estrutura primária, apresentando uma ponte dissulfeto, formando um peptídeo cíclico. O *Tnp* não possui efeito citotóxico em macrófagos murinos, bem como também não possui efeito danoso sobre fibras musculares ou na microcirculação do músculo cremaster de camundongos, além de não ser imunogênicos induzindo a produção de anticorpos específicos. O peptídeo *Tnp* apresenta capacidade de inibir a adesão e o rolamento dos leucócitos induzido pelo

agente inflamatório LPS na microcirculação de camundongos. Adicionalmente à inibição de adesão e rolamento dos leucócitos, observa-se após o tratamento com o *Tnp* a prevenção do recrutamento de leucócitos, particularmente neutrófilos e macrófagos, na cavidade peritoneal de camundongos injetados com LPS.

Interessantemente, o *Tnp* apresenta estrutura semelhante aos inibidores de serino-protease tipo Bowman-Birk (BBI) e tipo Kunitz, os quais foram primeiramente identificados em grãos de soja (ODANI; IKENAKA, 1973; PARK et al., 2007; QI et al., 2005). A família BBI compreende 71 aminoácidos e nove pontes de dissulfeto (KENNEDY et al., 1998; KENNEDY et al., 2005), enquanto a família Kunitz compreende 172 resíduos de aminoácidos e 2 pontes de dissulfeto que formam um sítio de ligação à protease inibindo-a, isto é, estes inibidores de proteases apresentam um sítio convexo que é complementar ao sítio ativo côncavo da protease (ONESTI et al., 1991). Baseado no fato de que inúmeras serino-proteases humanas como a elastase, a alfa-quimotripsina, quimase e catepsina-G são associadas com a função de células inflamatórias, e que estas proteases são sensíveis a inibição pelos inibidores BBI e/ou tipo Kunitz (LARIONOVA et al., 1993; WARE et al., 1997) atribuiu-se propriedades antiinflamatórias a estes inibidores.

A revisão sobre os mecanismos de doenças autoimunes e suas terapias sugere que é mais promissor reforçar ativamente os mecanismos fisiológicos imunomodulatórios (induzindo células e citocinas regulatórias), do que tentar excluir células auto-reativas de um repertório imune. E ainda mostra que é possível descobrir e utilizar novas drogas capazes de interferir no desencadeamento da doença autoimune na EM e prevenir o desenvolvimento da cronicidade da doença. Neste sentido, propomos o estudo dos principais efeitos imunomodulatórios do uso do peptídeo *Tnp* no controle dos sintomas e no adiamento do pico da doença utilizando um modelo murino de EAE.

CONCLUSÃO

Em conclusão, podemos dizer que este estudo permitiu um maior esclarecimento do efeito imunomodulador do *Tnp*, um peptídeo inédito derivado do veneno de *Thalassophryne nattereri* na EAE. O *Tnp* beneficemente interfere no circuito imunológico em vários estágios por mecanismos parcialmente dependentes de IL-10: 1) suprime o estado de ativação das cDC e propicia a emergência de pDC e de células reguladoras durante a fase de indução da EAE; 2) bloqueia o trânsito e a infiltração de leucócitos para o SNC pela supressão da atividade da MMP-9 e da expressão de CD18; 3) bloqueia a reativação e a permanência de linfócitos Th1 ou Th17 patogênicos no SNC; 4) impede a expansão de células da microglia e o infiltrado de macrófagos no SNC; 5) e ainda favorece o aumento localizado de células T reguladoras. O uso do *Tnp* durante ou entre as crises, ou continuamente gera efeitos sistêmicos ou localizados que resultam na atenuação da neuroinflamação e na prevenção da desmielinização, refletindo assim no adiamento do pico de aparecimento dos sintomas graves e na melhoria dos sinais clínicos da EAE (Fig. 24). Em conclusão podemos dizer que o *Tnp* possui as características importantes para o desenvolvimento de uma droga efetiva no controle da neuroinflamação, como a esclerose múltipla.

REFERÊNCIAS*

- ADAM E. H.; ALEXANDER J. W.; GIULIO D.; LAHIRU H.; GAVIN G.; SREERAM V. R. An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12496, 2010.
- ADELMAN, B.; SANDROCK, A.; PANZARA, M. A. Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 432-433, 2005.
- ADORINI, L.; NAGY, Z. A. Peptide competition for antigen presentation. **Immunol. Today**, v. 11, n. 1, p. 21-24, 1990.
- ARCHELOS, J. J.; PREVITALI, S. C.; HARTUNG, H. P. The role of integrins in immunemediated diseases of the nervous system. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 30-38, 1999.
- BAECHER-ALLAN, C.; BROWN, J. A.; FREEMAN, G. J.; HAFLER, D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, p.1245-1253, 2001.
- BANKSTON, A. N.; MANDLER, M. D.; FENG, Y. Oligodendroglia and neurotrophic factors in neurodegeneration. **Neurosci. Bull.** v. 29, n. 2, p. 216-28, 2013.
- BASU, R.; HATTON, R.D.; WEAVER, C.T. The Th17 family: flexibility follows function. **Immunol. Rev.**, v. 252, n. 1, p. 89-103, 2013.
- BAXTER, A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nature Rev. Immunol.**, v. 7, p. 904-912, 2007.
- BELKAID, Y.; CHEN, W. Regulatory ripples. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 12, p.1077-1078, 2010.
- BELLOSTA, S.; VIA, D.; CANAVESI, M.; PFISTER, P.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, p. 1671-1678, 1998.
- BENVENISTE, E. N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. **J. Mol. Med. Review**, v. 75, p. 165-173, 1997.
- BETTELLI, E.; DAS, M. P.; HOWARD, E. D.; WEINER, H. L.; SOBEL, R. A.; KUCHROO, V. K. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. **J. Immunol.**, v. 161, n. 7, p. 3299-3306, 1998.
- BIELEKOVA, B.; RICHERT, N.; HOWARD, T.; BLEVINS, G.; MARKOVIC-PLESE, S.; MCCARTIN, J.; FRANK, J. A.; WURFEL, J.; OHAYON, J.; WALDMANN, T. A.; MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, p. 8705-8708, 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BULJEVAC, D.; FLACH, H. Z.; HOP, W. C.; HIJDRA, D.; LAMAN, J. D.; SAVELKOUL, H. F.; VAN DER MECHE, F. G.; VAN DOORN, P. A.; HINTZEN, R. Q. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. **Brain**, v. 125, p. 952- 960, 2002.

BURT, R. K.; COHEN, B.; ROSE, J.; PETERSEN, F.; OYAMA, Y.; STEFOSKI, D.; KATSAMAKIS, G.; CARRIER, E.; KOZAK, T.; MURARO, P.A.; MARTIN, R.; HINTZEN, R.; SLAVIN, S.; KARUSSIS, D.; HAGGIAG, S.; VOLTARELLI, J.C.; ELLISON, G.W.; JOVANOVIC, B.; POPAT, U.; MCGUIRK, J.; STATKUTE, L.; VERDA, L.; HAAS, J.; ARNOLD, R. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. **Arch. Neurol.**, v. 62, p. 860-864, 2005.

CARTER, N. A.; VASCONCELLOS, R.; ROSSER, E. C.; TULONE, C.; MUÑOZ-SUANO, A.; KAMANAKA, M.; EHRENSTEIN, M. R.; FLAVELL, R. A.; MAURI, C. Mice Lacking Endogenous IL-10–Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. **J. Immunol.**, v. 186, p. 5525-5526, 2011.

CHEN, M. L.; YAN, B. S.; KOZORIZ, D.; WEINER, H. L. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 12, p. 3423-35, 2009.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1875-1886, 2003.

COLLISON, L. W.; CHATURVEDI, V.; HENDERSON, A. L.; GIACOMIN, P. R.; GUY, C.; BANKOTI, J.; FINKELSTEIN, D.; FORBES, K.; WORKMAN, C. J.; BROWN, S. A.; REHG, J. E.; JONES, M. L.; NI, H. T.; ARTIS, D.; TURK, M. J.; VIGNALI, D. A. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.*, v. 11(12), p. 1093-101, 2010. COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 1219-1226, 2004.

CORADDU, F.; SAWCER, S.; FEAKES, R.; CHATAWAY, J.; BROADLEY, S.; JONES, H. B.; CLAYTON, D.; GRAY, J.; SMITH, S.; TAYLOR, C.; GOODFELLOW, P. N.; COMPSTON, A. HLA typing in the United Kingdom multiple sclerosis genome screen. **Neurogenetics**, v. 2, n. 1, p. 24-33, 1998.

COX, C. A.; SHIN, G.; YIN, H.; VISTICA, B. P.; WAWROUSEK, E. F.; CHAN, C. C.; GERY, I. Both Th1 and Th17 are immunopathogenic but differ in other key biological activities. **J. Immunol.**, v. 180, p. 7414-7422, 2008.

CRISPIN, J.C.; MARTÍNEZ, A.; DE PABLO, P.; VELASQUILLO, C.; ALCOCER-VARELA, J. Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. **Scand. J. Immunol.**, v. 48, n. 2, p. 196-200, 1998.

DAI, H.; CIRIC, B.; ZHANG, G. X.; ROSTAMI, A. Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Bowman-Birk inhibitor. **J. Neuroimmunol.**, v. 245, n. 1-2, p. 1-7, 2012.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 3, p. 1041-1048, 1993.

DARIO, A.; VIGNALI, A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. **Nature Rev. Immunol.**, v. 8, p. 523-532, 2008.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; DE VRIES, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991.

DIA, V.P.; BERHOW, M.A.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Bowman-Birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in lipopolysaccharide-induced macrophages. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 11707-11717, 2008.

DITTEL, B. N. CD4 T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS. **Brain Behav. Immun.**, v. 22, p. 421-430, 2008.

EBERS, G. C.; SADOVNICK, A. D.; RISCH, N. J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*. v. 377, n. 6545, p.150-1, 1995.

ELLOSO, M. M.; PHIEL, K.; HENDERSON, R.A.; HARRIS, H. A.; ADELMAN, S. J. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands. **J. Endocrinol.**, v. 185, p. 243–252, 2005.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Inflammation in EAE: role of chemokine/cytokine expression by resident and infiltrating cells. **Neurochem. Res.**, v. 21, n. 4, p. 511-525, 1996.

ENGELHARDT, B.; MARTIN-SIMONET, M. T.; ROTT, L. S.; BUTCHER, E. C.; MICHIE, S. A. Adhesion molecule phenotype of T lymphocytes in inflamed CNS. **J. Neuroimmunol.**, v. 84, p. 92-104, 1998.

ENGELHARDT, B.; VAJKOCZY, P.; LASCHINGER, M. Detection of endothelial/lymphocyte interaction in spinal cord microvasculature by intravital videomicroscopy. **Methods Mol. Med.**, v. 89, p. 83-93, 2003.

ERSOY, E.; KUS, C. N. S.; ENERC, U. S.; OKERD, I.; ZORLU, Y. The effects of interferon- β on interleukin-10 in multiple sclerosis patients. **Eur. J. Neurol.**, v. 12, p. 208–211, 2005.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v. 146, n. 10, p. 3444-51, 1991.

FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 331-337, 2005.

GERMAIN, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell**, v. 76, p. 287, 1994.

GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. **Nature rev.**, v. 6, p. 358-370, 2006.

HAFLER, D. A.; SLAVIK, J. M.; ANDERSON, D. E.; O'CONNOR, K. C.; DE JAGER, P.; BAECHER-ALLAN, C. Multiple sclerosis. **Immunol. Rev.**, v. 204, p. 208-31, 2005.

HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C. T. 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, p. 1123-1132, 2005.

HARRISON, L.; HONEYMAN, M. C.; TREMBLEAU, S.; GREGORI, S.; GALLAZZI, F.; AUGSTEIN, P.; BRUSIC, V.; HAMMER, J.; ADORINI, L. A Peptide-binding Motif for I-Ag7, the Class II Major Histocompatibility Complex (MHC) Molecule of NOD and Biozzi AB/H Mice. **J. Exp. Med.**, v. 85, p. 1013–1021, 1997.

HARTUNG, H. P.; GONSETTE, R.; KONIG, N.; KWIECINSKI, H.; GUSEO, A.; MORRISSEY, S. P.; KRAPF, H.; ZWINGERS, T. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. **Lancet**, v. 360, p. 2018–2025, 2002.

HEMMER, B.; ARCHELOS, J. J.; HARTUNG, H. P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, p. 291–301, 2002.

HEMMER, B.; STUVE, O.; KIESEIER, B.; SCHELLEKENS, H.; HARTUNG, H.P. Immune response to immunotherapy: the role of neutralising antibodies to interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. **Lancet Neurol.**, v. 4, p. 403–412, 2005.

HOHLFELD, R., WIENDL, H. The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. **Ann. Neurol.**, v. 49, p.281-284, 2001.

HU, J.; VAN DEN STEEN, P.E.; SANG, Q.X.; OPDENAKKER, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature Rev. Drug. Discov.**, v. 6, p. 480–98, 2007.

HUANG, D.; WANG, J.; KIVISAKK, P.; ROLLINS, B.J; RANSOHOFF, R.M. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Mice Leads to Decreased Local Macrophage Recruitment and Antigen-specific T Helper Cell Type 1 Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 713–725, 2001.

HUITINGA, I.; DAMOISEAUX, J.G.M.C.; DÖPP, E.A.; DIJKSTRA, C.D. Treatment with anti-CR3 antibodies ED7 and ED8 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in lewis rats. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 709–715, 1993.

ISAKSSON, M.; ARDESJÖ, B.; RÖNNBLUM, L.; KÄMPE, O.; LASSMANN, H.; ELORANTA, M.L.; LOBELL, A. Plasmacytoid dendritic cells promote priming of autoimmune Th17 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 10, p. 2925-2935, 2009.

JACOBS, L. D.; COOKFAIR, D. L.; RUDICK, R. A.; HERNDON, R. M.; RICHERT, J. R.; SALAZAR, A. M.; FISCHER, J. S.; GOODKIN, D. E.; GRANGER, C. V.; SIMON, J. H.; ALAM, J. J.; BARTOSZAK, D. M.; BOURDETTE, D. N.; BRAIMAN, J.; BROWNSCHIEDLE, C. M.; COATS, M. E.; COHAN, S. L.; DOUGHERTY, D. S.; KINKEL, R. P.; MASS, M. K.; MUNSCHAUER, F. E.; 3RD, PRIORE, R. L.; PULLICINO, P. M.; SCHEROKMAN, B. J.; WHITHAM, R. H. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). **Ann. Neurol.**, v. 39, p. 285-294, 1996.

JOHNSON, K. P.; BROOKS, B. R.; COHEN, J. A.; FORD, C. C.; GOLDSTEIN, J.; LISAK, R. P.; MYERS, L. W.; PANITCH, H. S.; ROSE, J. W.; SCHIFFER, R. B. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. **Neurology**, v. 45, p. 1268-1276, 1995.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; KAKIRMAN, H.; STASSEN, M.; KNOP, J. ENK, A.H. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 255-260, 2002.

JORDAN, M. S.; BOESTEANU, A.; REED, A. J.; PETRONE, A. L.; HOLENBECK, A. E.; LERMAN, M. A.; NAJI, A.; CATON, A. J. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 301-306, 2001.

KALMAN, K.; PENNINGTON, M.W.; LANIGAN, M.D.; NGUYEN, A.; RAUER, H.; MAHNIR, V.; PASCHETTO, K.; KEM, W.R.; GRISSMER, S.; GUTMAN, G.A.; CHRISTIAN, E.P.; CAHALAN, M.D.; NORTON, R.S.; CHANDY, K.G. ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 32697–32707, 1998.

KASPER, L. H.; HAQUE, A.; HAQUE, S. Regulatory mechanisms of the immune system in multiple sclerosis. T regulatory cells: turned on to turn off. **J. Neurol.**, v.254, p. 10-14, 2007.

KENNEDY A. R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacol. Ther.**, v. 78, p. 167–209, 1998.

KENNEDY A. R. The status of human trials utilizing Bowman Birk Inhibitor Concentrate from soybeans. In Sugano M ed. Soy in health and disease prevention . **CRC Press LLC**, 2005.

KENNEDY, M. K.; TORRANCE, D. S.; PICHA, K. S.; MOHLER, K. M. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. **J. Immunol.**, v. 149, n. 7, p. 2496-505, 1992.

KUCHROO, V.K.; ANDERSON, A.C.; WALDNER, H.; MUNDER, M.; BETTELLI, E.; NICHOLSON, L.B. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 101–123, 2002.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; MYIT, S.; MACH, F. Statins as a newly recognised type of immunomodulator. **Nature Med.**, v. 6, p. 1399–1402, 2000.

LAMONT, A. G.; POWELL, M. F.; COLÓN, S. M.; MILES, C.; GREY, H. M.; SETTE, A. The use of peptide analogs with improved stability and MHC binding capacity to inhibit antigen presentation *in vitro* and *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 144, n. 7, p. 2493-8, 1990.

LARIONOVA, N. I.; GLADYSHEVA, I. P.; TIKHONOVA, T. V.; KAZANSKAIA, N. F. Inhibition of cathepsin G and elastase from human granulocytes by multiple forms of the Bowman-Birk type of soy inhibitor. **Biokhimiia**. v. 58, n. 9, p. 1437-44, 1993.

LEE, Y.; MORRISON, B.M.; LI, Y.; LENGACHER, S.; FARAH, M.H.; HOFFMAN, P.N.; LIU, Y.; TSINGALIA, A.; JIN, L.; ZHANG, P.W.; PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J.; ROTHSTEIN, J.D. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. **Nature** v. 487, p. 443–448, 2012.

LEE, Y.K.; MUKASA, R.; HATTON, R.D.; WEAVER, C.T. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. **Curr Opin Immunol.**, v. 21, n. 3, p. 274-80, 2009.

LEVINGS, M.K.; SANGREGORIO, R.; RONCAROLO, M.G. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of function. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1295-1302, 2001.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature rev.**, v.2, p. 790-802, 2003.

LUBLIN, F.D.; REINGOLD, S.C. "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey," **Neurol.**, v. 46, n. 4, p. 907–911, 1996.

LUND, F.E.; RANDALL, T.D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4⁺ T cell immunity. **Nature Rev. Immunol.**, v. 10, p. 236-247, 2010.

MAHNKE, K.; QIAN, Y.; KNOP, J.; ENK, A. H. Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. **Blood.**, v. 101, n. 12, p. 4862-9, 2003.

MANN, M. K.; MARESZ, K.; SHRIVER, L. P.; TAN, Y.; DITTEL, B. N. B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, v. 178, p. 3447–3456, 2007.

MASTELLER, E.L.; TANG, Q.; BLUESTONE, J.A. Antigen-specific regulatory T cells -- ex vivo expansion and therapeutic potential. **Semin. Immunol.**, v. 18, p. 103-110, 2006.

MATHISEN, P. M.; YU, M.; JOHNSON, J. M.; DRAZBA, J. A.; TUOHY, V. K. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with genetically modified memory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 1, p. 159-64, 1997.

MATSUSHITA, T.; HORIKAWA, M.; IWATA, Y.; TEDDER, T. F. Regulatory B cells (B10 Cells) and regulatory t cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. **J. Immunol.**, v. 185, p. 2240-2252, 2010.

MATSUSHITA, T.; YANABA, K.; BOUAZIZ, J.D.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T. F. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 3420–3430, 2008.

MCELROY, J. P.; OKSENBERG, J. R. Multiple sclerosis genetics. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 318, p. 45–72, 2008.

MCGEACHY, M.J.; STEPHENS, L.A.; ANDERTON, S.M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells within the central nervous system. **J. Immunol.**, v. 175, n. 5, p. 3025-32, 2005.

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

METZ, L. M.; ZHANG, Y.; YEUNG, M.; PATRY, D. G.; BELL, R. B.; STOIAN, C. A.; YONG, V. W.; PATTEN, S. B.; DUQUETTE, P.; ANTEL, J. P.; MITCHELL, J. R. Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 55, p. 756, 2004.

MILLER, E. Multiple sclerosis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.724, p. 222-38, 2012.

MILSTONE, A. M.; HARRISON, L. M.; BUNGIRO, R. D.; KUZMIC, P.; CAPPELLO, M. A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 38, p. 29391-9, 2000.

MIYAMOTO, K.; MIYAKE, S.; MIZUNO, M.; OKA, N.; KUSUNOKI, S.; YAMAMURA, T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2-independent pathway. **Brain**, v. 129, p. 1984–1992, 2006.

MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 165-90, 1993.

MOSER, M.; DE SMEDT, T.; SORNASSE, T.; TIELEMANS, F.; CHENTOUFI, A. A.; MURAILLE, E.; VAN MECHELEN, M.; URBAIN, J.; LEO, O. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function *in vitro* and *in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 10, p. 2818-24, 1995.

NEUHAUS, O.; FARINA, C.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 56, p. 702-708, 2001.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. 8. Disulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor. **J. Biochem.**, v. 74, n. 4, p. 697-715, 1973.

OLERUP, O.; HILLERT, J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. **Tissue Antigens**, v. 38, p. 1-15, 1991.

ONESTI, S.; BRICK, P.; BLOW, D. M. Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. **J. Mol. Biol.**, v. 217, n. 1, p. 153-76, 1991.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 221-233, 2007.

PALMER, A. M. Multiple sclerosis and the blood-central nervous system barrier. **Cardiovasc. Psychiatry Neurol.**, v. p. 1 -10, 2013.

PARK, J. H.; JEONG, H. J.; LUMEN, B. O. *In vitro* digestibility of the cancer-preventive soy peptides lunasin and BBI. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, n. 26, p. 10703-6, 2007.

PASCHALIDIS, N.; IQBAL, A. J.; MAIONE, F.; WOOD, E. G.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J.; D'ACQUISTO, F. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by endogenous annexin A1. **J. Neuroinflammation.**, v. 6, p. 33, 2009.

PEÑA-CRUZ, V.; MCDONOUGH, S. M.; DIAZ-GRIFFERO, F.; CRUM, C. P.; CARRASCO, R. D.; FREEMAN, G. J. PD-1 on immature and PD-1 ligands on migratory human Langerhans cells regulate antigen-presenting cell activity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 130, n. 9, p. 2222-30, 2010.

PENNA, G., ADORINI, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2405-2411, 2000.

POLMAN, C.H.; REINGOLD, S.C.; EDAN, G.; FILIPPI, M.; HARTUNG, H.P.; KAPPOS, L.; LUBLIN, F.D.; METZ, L.M.; MCFARLAND, H.F.; O'CONNOR, P.W.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; THOMPSON, A.J.; WEINSHENKER, B.G.; WOLINSKY, J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald criteria". **Ann Neurol.**, v. 58, p. 840-846, 2005.

PUENTE X.S.; SANCHEZ L.M.; OVERALL C.M.; LOPEZ-OTIN, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Reviews Genetics**, v 4, p. 544–558, 2003.

QI, R.F.; SONG, Z.W.; CHI, C.W. Structural features and molecular evolution of Bowman–Birk protease inhibitors and their potential application (Shanghai.) **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 37, p. 283–292, 2005.

RACKE, M. K.; BONOMO, A.; SCOTT, D. E.; CANNELLA, B.; LEVINE, A.; RAINE, C. S.; SHEVACH, E. M.; RÖCKEN, M. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 5, p. 1961-1966, 1994.

RAY, A.; BASU, S.; WILLIAMS, C. B.; SALZMAN, N. H.; DITTEL, B. N. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. **J. Immunol.**, v. 188, n. 7, p. 3188-3198, 2012.

REMLINGER, P. Les paralysies du traitement antirabique. **Ann. Institut. Pasteur**, v. 55, p. 35–68, 1928.

RIVERS, T. M.; SPRUNT, D. H.; GERRY, B. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **J. Exp. Med.**, v. 58, p. 39–53, 1933.

ROMANO, M.; DIOMEDE, L.; SIRONI, M.; MASSIMILIANO, L.; SOTTOCORNO, M.; POLENTARUTTI, N.; GUGLIELMOTTI, A.; ALBANI, D.; BRUNO, A.; FRUSCELLA, P.; SALMONA, M.; VECCHI, A.; PINZA, M.; MANTOVANI, A. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. **Lab. Invest.**, v. 80, p. 1095–1100, 2000.

ROVARIS M.; CONFAVREUX C.; FURLAN R.; KAPPOS COMI, L. G.; FILIPPI, M. “Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. **Lancet Neurology**, v. 5, n. 4, p. 343–354, 2006.

RUDICK, R. A.; TRAPP, B. D. Gray-matter injury in multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.** v. 361, p. 1505–1506, 2009.

RUNIA, T. F.; VAN PELT-GRAVESTEIJN, E. D.; HINTZEN, R. Q. Recent Gains in Clinical Multiple Sclerosis Research Review. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, 2012.

SADOVNICK, A. D.; EBERS, G. C.; DYMENT, D. A.; RISCH, N. J. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. **Lancet**, v. 347, n. 9017, p. 1728-1730, 1996.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v.155, p. 1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R. YAGI, H.; HORI, S.; FEHERVARI, Z.; SHIMIZU, J.; TAKAHASHI, T.; NOMURA, T. FoxP3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant selftolerance and autoimmune disease. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 8–27, 2006.

SAMOILOVA, E. B.; HORTON, J. L.; CHEN, Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. **Cell Immunol.**, v. 188, n. 2, p. 118-124, 1998.

SERADA, S.; FUJIMOTO, M.; MIHARA, M.; KOIKE, N.; OHSUGI, Y.; NOMURA, S.; YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, T.; TERABE, F.; OHKAWARA, T.; TAKAHASHI, T.; RIPLEY, B.; KIMURA, A.; KISHIMOTO, T.; NAKA, T. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 9041-9046, 2008.

SERRA, P.; AMRANI, A.; YAMANOUCHI, J.; HAN, B.; THIESSEN, S.; UTSUGI, T.; VERDAGUER, J.; SANTAMARIA, P. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. **Immunity**, v. 19, p. 877-889, 2003.

SHIGETOMI, H.; ONOGI, A.; KAJIWARA, H.; YOSHIDA, S.; FURUKAWA, N.; HARUTA, S.; TANASE, Y.; KANAYAMA, S.; NOGUCHI, T.; YAMADA, Y.; OI, H.; KOBAYASHI, H. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. **Inflamm. Res.**, v. 59, n. 9, p. 679-687, 2010.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 683-747, 2005.

STEINMAN, L.; ROSENBAUM, J. T.; SRIRAM, S.; MCDEVITT, H. O. *In vivo* effects of antibodies to immune response gene products: prevention of experimental allergic encephalitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 78, n. 11, p. 7111-7114, 1981.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 685-711, 2003.

STUVE, O.; CEPOK, S.; ELIAS, B.; SALEH, A.; HARTUNG, H.P.; HEMMER, B.; KIESEIER, B.C. Clinical stabilization and effective B-lymphocyte depletion in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of a patient with fulminant relapsing-remitting multiple sclerosis. **Arch Neurol.**, v. 62, p.1620-1623, 2005.

STUVE, O.; CREE, B. C.; VON BUDINGEN, H. C.; YOUSEF, S.; BOWEN, J. D.; GENAIN, C. P.; HAUSER, S. L.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Approved and future pharmacotherapy for multiple sclerosis. **Neurologist**, v. 8, p.290-301, 2002.

SUAREZ-KURTZ, G.; VIANNA-JORGE, R.; PEREIRA, B. F.; GARCIA, M. L.; KACZOROWSKI, G. J. Peptidyl inhibitors of shaker-type Kv1 channels elicit twitches in guinea pig ileum by blocking kv1.1 at enteric nervous system and enhancing acetylcholine release. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 289, n. 3, p.1517-22, 1999.

THEIL, M.M.; MIYAKE, S.; MIZUNO, M.; TOMI,C.; CROXFORD, J.L.; HOSODA, H.; THEIL, J.; VON HORSTEN, S.; YOKOTE, H.; CHIBA, A.; LIN, Y.; OKI, S.; AKAMIZU, T.; KANGAWA, K.; YAMAMURA, T. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Ghrelin1. **J. Immunol.**, v. 183, p. 2859-2866, 2009.

VAN OOSTEN, B.W.; LAI, M.; BARKHOF, F.; MILLER, D.H.; MOSELEY, I.F.; THOMPSON, A.J.; HODGKINSON, S.; POLMAN, C.H. A phase II trial of anti-CD4 antibodies in the treatment of multiple sclerosis. **Mult. Scler.**, v. 1, p. 339-342, 1996.

VANDENBARK, A. A.; FINN, T.; BARNES, D.; CULBERTSON, N.; CHOU, Y. K.; HICKS, K.; BAKKE, A.; MASS, M.; WHITHAM, R.; OFFNER, H.; BOURDETTE, D. Diminished frequency of interleukin-10-secreting, T-cell receptor peptide-reactive T cells in multiple sclerosis patients might allow expansion of activated memory T cells bearing the cognate BV gene. **J. Neurosci. Res.**, v. 66, n. 2, p. 171-6, 2001.

VOLLMER, T.; KEY, L.; DURKALSKI, V.; TYOR, W.; CORBOY, J.; MARKOVIC-PLESE, S.; PREININGEROVA, J.; RIZZO, M.; SINGH, I. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Lancet**, v. 363, p. 1607-1608, 2004.

WADA, Y.; HISAMATSU, T.; KAMADA, N.; OKAMOTO, S.; HIBI, T. Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v. 15, n. 10, p. 1548-1556, 2009.

WARE, J. H.; WAN, X. S.; RUBIN, H.; SCHECHTER, N. M.; KENNEDY, A. R. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 344, n. 1, p. 133-138, 1997.

WEITZ-SCHMIDT, G.; WELZENBACH, K.; BRINKMANN, V.; KAMATA, T.; KALLEN, J.; BRUNS, C.; COTTENS, S.; TAKADA, Y.; HOMMEL, U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. **Nature Med.**, v. 7, p. 687-692, 2001.

WORD HEALTHY ORGANIZATION. **Atlas Multiple Sclerosis**. 2008. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/neurology/Atlas_MS_WEB.pdf. Acesso em: 25 out. 2012.

WRAITH, D. C.; SMILEK, D. E.; MITCHELL, D. J.; STEINMAN, L.; MCDEVITT, H. O. Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. **Cell.**, v. 59, n. 2, p. 247-55, 1989.

YANG, J.; JIANG, Z.; FITZGERALD, D.C.; MA, C.; YU, S.; LI, H.; ZHAO, Z.; LI, Y.; CIRIC, B.; CURTIS, M.; ROSTAMI, A.; ZHANG, G.X. Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 12, p. 3678-91. 2009.

YONG, V. W. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. **Neurology**, v. 59, p. 802-808, 2002.

YONG, V.W. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature Rev. Neurosci.*, v. 6, p. 931-944, 2005.

YOUSSEF, S.; STÜVE, O.; PATARROYO, J. C.; RUIZ, P. J.; RADOSEVICH, J. L.; HUR, E. M.; BRAVO, M.; MITCHELL, D. J.; SOBEL, R. A.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. **Nature**, v. 420, p. 78-84, 2002.

YU, C. R.; LEE, Y. S.; MAHDI, R. M.; SURENDRAN, N.; EGWUAGU, C. E. Therapeutic targeting of STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3) pathway inhibits experimental autoimmune uveitis. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. 29742, 2012.

ZHANG, B.; YAMAMURA, T.; KONDO, T.; FUJIWARA, M.; TABIRA, T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. **J. Exp. Med.**, v. 186, p. 1677-1687, 1997.

ZHANG, J.; WEINER, H. L.; HAFLER, D. A. Autoreactive T cells in multiple sclerosis. **Int. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 183-201, 1992.

ZOZULYA, A. L.; WIENDL, H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 4, n. 8, p. 384-398, 2008.