UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Carla Roberta Nunes Polachini

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DOS SISTEMAS COLINÉRGICO E PURINÉRGICO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA: ESTUDO CLÍNICO E DE REVISÃO

Santa Maria, RS
2018

Carla Roberta Nunes Polachini

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DOS SISTEMAS COLINÉRGICO E PURINÉRGICO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA: ESTUDO CLÍNICO E DE REVISÃO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Profª Drª. Vera Maria Melchiors Morsch
Coorientadora: Profª Drª. Roselia Maria Spanevello

Santa Maria, RS
2018

Polachini, Carla Roberta Nunes
Envolvimento do estresse oxidativo e dos sistemas colinérgico e purinérgico na esclerose múltipla: estudo clínico e de revisão / Carla Roberta Nunes Polachini.- 2018.
184 p.; 30 cm

Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch
Coorientadora: Roselia Maria Spanevello
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2018

1. Desmielinização 2. Inflamação 3. Pró-oxidantes 4. Antioxidantes 5. Sistema colinérgico I. Morsch, Vera Maria Melchiors II. Spanevello, Roselia Maria III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2018
Todos os direitos autorais reservados a Carla Roberta Nunes Polachini. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: polachini.carla@gmail.com

Carla Roberta Nunes Polachini

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DOS SISTEMAS COLINÉRGICO E PURINÉRGICO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA: ESTUDO CLÍNICO E DE REVISÃO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Aprovado em 23 de fevereiro de 2018:

Vera Maria Melchiors Morsch, Dra. (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)

Carina Rodrigues Boeck, Dra. (Unifra)

Francieli Moro Stefanello, Dra. (UFPel)

Gabriela Trevisan dos Santos, Dra. (UFSM)

Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe, pelos ensinamentos de vida, pelo amor incondicional, pelo apoio nas horas difíceis e incentivo a nunca desistir.

Obrigada por ter acreditado no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Uma grande meta foi realizada e muitas pessoas especiais estavam ao meu lado me motivando a atingi-la! Por isso, dedico as próximas linhas para agradecer àqueles que me ajudaram, a fim de que esta meta fosse concretizada.

Agradeço primeiramente a Deus, maior mestre de todos, por me permitir desfrutar de saúde e paz. Obrigada, por sua infinita bondade e amor em proporcionar-me a realização de mais um objetivo.

À minha amada mãe Maria Elizete, exemplo de retidão e vida. Um ser humano especial que, com muita simplicidade, carinho e amor, sempre me ensinou tudo aquilo que realmente importa na vida. E, com ela aprendi que todas as escolhas implicam em perdas. Obrigada, por estar sempre presente em minha vida, me protegendo e orientando. Te amo e serei eternamente grata!

À minha querida família pelo apoio e carinho, bem como pela compreensão de que a distância física e a ausência em alguns momentos, tornam-se necessárias na busca de nossos objetivos.

Agradeço a minha querida mestre e orientadora Dra. Vera Maria Morsch, que muito admiro, por ser sempre tão atenciosa, amiga e por ter acreditado em mim e na minha pesquisa. Minha gratidão pelo incentivo à minha autonomia e pela compreensão nos momentos em que não pude me dedicar tanto quanto eu gostaria. Obrigada pelas reflexões e troca de conhecimentos, ao longo desses anos e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À querida mestre, coorientadora e amiga Dra. Roselia M. Spanevello, exemplo de pessoa e profissional com quem a vida me presenteou, sinto-me privilegiada por tê-la como amiga. Minha eterna gratidão pelo incentivo constante, pelos momentos em que não hesitou em me auxiliar, estando sempre disponível a compartilhar seus conhecimentos! Obrigada, pela paciência de sanar as minhas dúvidas, me tranquilizar quando as adversidades apareciam, e acreditar no meu potencial.

Agradeço à querida mestre Dra. Maria Rosa Schetinger, que também me acompanhou nessa trajetória e por quem tenho grande carinho e admiração. Obrigada, por estar sempre disposta a auxiliar e contribuir com sua experiência, bem como pelo apoio e incentivo ao meu trabalho.

As professoras Carina Rodrigues Boeck, Francieli Moro Stefanello, Gabriela Trevisan dos Santos e Maribel Antonello Rubin, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese, bem como pelas fundamentais contribuições.

À Juci, obrigada pela amizade sincera, pelo companheirismo, por compartilharmos momentos bons e ruins, além de sempre me incentivar e torcer por mim.

A todos os amigos e colegas do laboratório 2208, pelo apoio, ajuda, pelos momentos de descontração e contribuição para a execução deste trabalho.

Aos meus alunos e colegas professores do Curso de Fisioterapia da UFSM, que durante o período em que estive como professora substituta sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos pacientes e familiares, por terem aceitado e se disponibilizado a participar deste estudo.

Agradeço, à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica Toxicológica pela oportunidade de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FAPERGS, pelo apoio financeiro ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que de diferentes maneiras me apoiaram, contribuindo e dando-me alento para a concretização desta tese, a minha gratidão e meu respeito. Obrigada!

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

“[...] Já podaram seus momentos,
desviaram seu destino,
seu sorriso de menino tantas vezes
se escondeu, mas
renova-se a esperança, nova aurora
a cada dia, e há que se cuidar do broto pra
que a vida nos dê flor e fruto [...].”

(Milton Nascimento)

RESUMO

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DOS SISTEMAS COLINÉRGICO E PURINÉRGICO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA: ESTUDO CLÍNICO E DE REVISÃO

AUTORA: Carla Roberta Nunes Polachini
ORIENTADORA: Profª Drª. Vera Maria Melchiors Morsch
COORIENTADORA: Profª Drª. Roselia Maria Spanevello

A esclerose múltipla (EM) é uma das principais doenças inflamatórias crônicas do sistema nervoso central (SNC) que causa incapacitação funcional em adultos jovens. É considerada uma enfermidade autoimune e neurodegenerativa complexa, já que possui diversos processos envolvidos em seu advento, incluindo inflamação, desmielinização, lesão axonal e mecanismos de reparo. Estudos têm sugerido uma estreita relação entre um aumento dos agentes pró-oxidantes, a presença de eventos pró-inflamatórios e modificações na resposta imune. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar biomarcadores de estresse oxidativo como: níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o conteúdo de proteína carbonil em soro, danos ao DNA em leucócitos, bem como a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e delta-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) em sangue total. Adicionalmente, foram determinados os níveis de antioxidantes não enzimáticos, como: a vitamina C, vitamina E, tiois não proteicos (NPSH) e vitamina D em soro. Para este estudo, avaliou-se dois grupos: Grupo EM composto por pacientes diagnosticados com a forma remitente-recorrente da EM (RREM) e Grupo Controle (GC), composto por voluntários saudáveis. Os resultados obtidos demonstraram aumento na atividade da CAT concomitante a redução na atividade da SOD em sangue total de pacientes com RREM quando comparados com indivíduos saudáveis. Igualmente, foi observado uma elevação na peroxidação lipídica e nos níveis de proteína carbonil em soro, bem como o aumento no dano ao DNA em leucócitos dos pacientes com RREM quando comparados com o GC. Outra constatação importante, foi a elevação da atividade da δ-ALA-D em sangue total nos pacientes com RREM em comparação com o GC. Ainda, os níveis de vitamina C, vitamina E, NPSH e vitamina D foram significativamente diminuídos em indivíduos com RREM quando comparado ao GC. Além disso, buscou-se analisar o envolvimento dos sistemas colinérgico e purinérgico tanto em pacientes como em modelos experimentais de EM, já que esses sistemas parecem influenciar de modo significativo a ativação e manutenção do sistema imune, além de participarem do controle e resolução da resposta inflamatória. Neste cenário, realizou-se uma ampla revisão das descobertas existentes na literatura científica, e por meio de um artigo de revisão, demonstrou-se a relevante implicação desses sistemas na patogênese da EM. Assim, a partir dos resultados obtidos nestes estudos, sugere-se que há uma alteração no balanço oxidante/antioxidante em pacientes com RREM evidenciado pela resposta encontrada por meio dos biomarcadores de estresse oxidativo. Ainda, os sistemas colinérgico e purinérgico influenciam os mecanismos que sinalizam, regulam e controlam as respostas inflamatória e imune na EM, por conseguinte a associação desses fatores podem cooperar para o surgimento e/ou desencadear os surtos característicos da doença. Também, sugere-se a existência de uma resposta pró-inflamatória contínua, tanto central quanto periférica. Juntos esses achados, contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos etiopatogênicos envolvidos nessa doença, além de serem úteis para ampliar a terapêutica e monitoramento desse distúrbio neurodegenerativo em benefício da qualidade de vida dos indivíduos com EM.

Palavras-chave: Desmielinização. Inflamação. Pró-oxidantes. Antioxidantes. Sistema colinérgico. Sinalização purinérgica.

ABSTRACT

INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS AND CHOLINERGIC AND PURINERGIC SYSTEMS IN MULTIPLE SCLEROSIS: CLINICAL AND REVIEW STUDY

AUTHOR: CARLA ROBERTA NUNES POLACHINI
ADVISOR: PROFª DRª. VERA MARIA MELCHIORS MORSCH
CO-ADVISOR: PROFª DRª. ROSELIA MARIA SPANEVELLO

Multiple sclerosis (MS) is one of the main chronic inflammatory diseases of the central nervous system (CNS) that cause functional disability in young adults. It is considered one complex autoimmune and neurodegenerative illness, since it has several processes involved in its arrival, including inflammation, demyelination, axonal damage and repair mechanisms. Studies have suggested that there is a close relationship between an increase of the pro-oxidants agents, the presence of pro-inflammatory events and modifications in the immune response. Thus, the aim of this study was to verify oxidative stress biomarkers such as levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl content in serum, DNA damage in leukocytes, as well as the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and delta-aminolevulinate dehydratase (δ-ALA-D) enzymes in whole blood. Additionally, we determined the levels of non-enzymatic antioxidants, such as vitamin C, vitamin E, non-protein thiol (NPSH) and vitamin D in serum. For this study, two groups were evaluated: EM group composed of patients diagnosed with the relapsing-remitting form of MS (RRMS) and Control Group (CG), composed of healthy volunteers. The results showed increase CAT activity simultaneously the reduction in the activity of SOD in whole blood from RRMS patients when compared with healthy subjects. Likewise, we observed an elevation in levels lipid peroxidation and carbonyl protein in serum as well as the increase DNA damage in leukocytes from RRMS patients when compared to GC. Another important finding was the elevation of δ-ALA-D activity in whole blood in RRMS patients compared to GC. Furthermore, the vitamin C, vitamin E, NPSH and vitamin D levels were significantly decreased in RRMS individuals when compared to GC. In addition, we sought to analyze the involvement of the cholinergic and purinergic systems in both patients and experimental models of MS because these systems seem to have a significant influence on the activation and maintenance of the immune system besides they participate in the control and resolution of the response inflammatory. In this scenario, an extensive review of the existing findings in the scientific literature and it showed through a review article the relevant implication of these systems in the pathogenesis of MS. Thus, the results obtained from these studies suggest that there is an alteration in the oxidative/antioxidant balance in patients with RRMS, we evidenced by the response found through oxidative stress biomarkers. In addition, the cholinergic and purinergic systems influence the mechanisms that signal, regulate and control inflammatory and immune responses in MS, therefore the association of these factors could cooperate to the onset and/or trigger the outbreaks in MS. Also, it is suggested the existence of a continuous pro-inflammatory response both central and peripheral. Taken together, these findings contribute to a better understanding of the etiopathogenic mechanisms involved in this disease besides may be useful to extend the therapeutic and monitoring of this neurodegenerative disorder in benefit of the quality of life of MS individuals.

Keywords: Demyelination. Inflammation. Pro-oxidants. Antioxidants. Cholinergic system. Purinergic signaling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Representação da bainha de mielina no SNC e as modificações que ocorrem durante o processo da esclerose múltipla 32
Figura 2 – Fatores etiológicos e patogênicos envolvidos na esclerose múltipla.36
Figura 3 – Formas de esclerose múltipla.....39
Figura 4 – Histórico referente a descoberta e o desenvolvimento de fármacos usados para o tratamento da esclerose múltipla 44
Figura 5 – Mecanismos de danos oxidativos e citoproteção na lesão desmielinizante da esclerose múltipla no sistema nervoso central ...47
Figura 6 – Relação entre estresse oxidativo/nitrosativo, inflamação e neurodegeneração 51
Figura 7 – Esquema ilustrando o sistema colinérgico com uma visão geral da acetilcolina: síntese, armazenamento, liberação e interação com seus receptores 52
Figura 8 – Representação esquemática do sistema colinérgico e a esclerose múltipla em humanos 55
Figura 9 – Visão geral mostrando os mecanismos responsáveis pelo controle da intensidade e/ou duração da transmissão purinérgica 57
Figura 10 – Sinalização purinérgica: efeitos da ação dos nucleotídeos extracelulares sobre as células do sistema imune e suas implicações nas doenças. Essa Figura mostra que a ativação dos receptores purinérgicos, presentes nas células que constituem o sistema imune, em resposta a estimulação pelo ATP e/ou adenosina, desencadeia uma diversidade de respostas que influenciarão no processo saúde-doença 60
Figura 11 – Desenho esquemático do sistema purinérgico e a esclerose múltipla em humanos 62
Figura 12 – Perspectivas para estudos futuros envolvendo biomarcadores, sistema colinérgico e pacientes com esclerose múltipla.....155

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 – δ-ALA-D activity in the whole blood of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. ***Indicates a significant difference from the control group (Student´s *t*-test, ****P*<0.0001, n =29)……..……. 92
Figure 2 – Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the serum of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. ***Indicates a significant difference from the control group (Student´s t-test, ****P*<0.0001, n = 29)..... 93
Figure 3 – Carbonyl protein content in the serum of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. *Represents a significant difference from the control group (Student´s t-test, **P*<0.05, n =20)…… 93

Figure 4 – The comet assay on the leukocytes of healthy subjects and MS patients. (a) Comet image of blood cells showing a nucleus without damage and nuclei with different damage levels. (b) DNA damage comparison between healthy subjects and MS patients. DNA index damage calculation Σ (1,2,3,4 comet class)/100. **Represents a significant difference from the control group (Student´s t-test, ***P*<0.001, n = 22)…… 94
Figure 5 – Enzymatic antioxidant: superoxide dismutase (a) and catalase (b) activities in the whole blood of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. **Represents a significant difference from the control group (Student´s *t*-test, ***P*<0.001, n =29)…… 95
Figure 6 – Non-enzymatic antioxidant: vitamin C (a), vitamin E (b) and non-protein thiol (NPSH) (c) levels in the serum of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. ***Represents a significant difference from the control group (Student´s *t*-test, ****P*<0.0001, n = 29 and **P<0.001, n = 20, respectively)……..…... 96
Figure 7 – Vitamin D quantification in the serum of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. *Represents significant difference from the control group (Student´s *t*-test, **P*<0.05, n = 29)……..... 97

MANUSCRITO

Figure 1 – Overview of the possible influence of the cholinergic system in humans and an animal experimental model of MS……..…… 142
Figure 2 – Schematic representation of possible action mechanisms on the purinergic system in humans and an animal experimental model of MS……..…… 143

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 – General characteristics of subjects..... 98
Table 2 – Blood parameter of MS patients and healthy subjects……...….. 99
Table 3 – Activity of d-ALA-D and its correlation with oxidative stress parameters in RRMS patients……..……. 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChRs	Receptores de acetilcolina
ADA	Adenosina desaminase
ADP	Adenosina difosfato
ALA	Ácido 5'-aminolevulínico ou ácido delta-aminolevulínico
δ-ALA-D	Delta-aminolevulinato desidratase
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BChE	Butirilcolinesterase
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
ChAt	Colina-acetiltransferase
ChT	Transportador de colina
CHCM	Hemoglobina corpuscular média
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDSS	Escala expandida do estado de incapacidade
EM	Esclerose múltipla
E-NPP	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase
E-NTPDase	Ectonucleosídeo trifosfatodifosfohidrolase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	*Food and Drug Administration*
GC	Grupo controle
GSH	Glutationa
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IAChEs	Inibidores da acetilcolinesterase
IFNs	Interferons
IFN β	Interferon beta
IL	Interleucina
IRM	Imagem por ressonância magnética
LCR	Líquido cefalorraquidiano
mAChR	Receptor de acetilcolina muscarínico
nAChR	Receptor de acetilconia nicotínico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto
NPSH	Tiois não-proteicos
NK	Natural *Killer*
PPEM	Forma progressiva primária da esclerose múltipla
PSEM	Forma progressiva secundária da esclerose múltipla
$P2X_7R$	Receptor purinérgico $P2X_7$

RDW	*Red cell distribution width*
RREM	Forma remitente-recorrente da esclerose múltipla
PREM	Forma progressiva-recorrente da esclerose múltipla
SAH	S-adenosil-homocisteína
SH	Grupos sulfidrila
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
SREM	Forma surto-remissão da esclerose múltipla
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Th	T *helper*
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UDP	Uracila difosfato
UTP	Uracila trifosfato
vAChT	Transportador de acetilcolina vesicular
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO 23

2 INTRODUÇÃO 25

3 REFERENCIAL TEÓRICO 29

3.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM) 29

3.1.1 Histórico 29

3.1.2 Conceito ou definição 31

3.1.3 Epidemiologia 32

3.1.4 Etiologia e patogênese 34

3.1.5 Manifestações clínicas 37

3.1.6 Formas de EM 38

3.1.7 Diagnóstico 40

3.1.8 Tratamento 41

3.2 RELAÇÃO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E SISTEMA IMUNE PERIFÉRICO COM A ESCLEROSE MÚLTIPLA 44

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO E A ESCLEROSE MÚLTIPLA 46

3.4 SISTEMA COLINÉRGICO E A ESCLEROSE MÚLTIPLA 51

3.5 SISTEMA PURINÉRGICO E A ESCLEROSE MÚLTIPLA 56

4 OBJETIVOS 63

4.1 OBJETIVO GERAL 63

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 63

5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS 65

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 65

5.2 MANUSCRITO 100

6 DISCUSSÃO 145

7 CONCLUSÕES 153

8 PERSPECTIVAS 155

REFERÊNCIAS 157

ANEXO 179

ANEXO A – PARECER DO CEP 181

1 APRESENTAÇÃO

A presente tese de Doutorado segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) de 2015. Essa tese compreende dois estudos relacionados a pacientes com esclerose múltipla, sendo que no segundo também buscou-se analisar e discutir modelos experimentais da doença.

O primeiro estudo verificou alguns biomarcadores de estresse oxidativo, incluindo o TBARS, conteúdo de carbonil, danos ao DNA, a atividade da δ-ALA-D, os níveis de vitamina D, e ainda certos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Essas avaliações foram realizadas em sangue total e no soro de pacientes com a forma remitente-recorrente da esclerose múltipla, sendo que os resultados provenientes deste trabalho originaram um artigo científico publicado no periódico *Neurotoxicity Research*.

O segundo estudo aqui apresentado buscou investigar a influência, e consequente importância dos sistemas colinérgico e purinérgico na esclerose múltipla, por meio de uma revisão da produção científica mundial. Essa análise gerou um manuscrito que está estruturado de acordo com as normas para a publicação na revista científica *Journal of the Neurological Sciences* para a qual o manuscrito foi submetido.

As seções MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO E REFERÊNCIAS encontram-se no **ARTIGO CIENTÍFICO** e no próprio **MANUSCRITO**, os quais representam a íntegra desse estudo. Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÕES, encontrados no final dessa tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico e o manuscrito contidos nesse trabalho. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO dessa tese.

2 INTRODUÇÃO

No sistema nervoso central (SNC), os oligodendrócitos, são subtipos de células gliais responsáveis pela síntese da bainha de mielina que reveste os axônios, permitindo uma rápida propagação dos impulsos elétricos através do sistema nervoso, e garantindo a entrega do potencial de ação à célula-alvo (OLSEN; AKIRAV, 2015).

Algumas doenças podem atingir os axônios, e por conseguinte ocasionar danos e/ou perda da bainha de mielina, por meio de um processo conhecido como desmielinização, comprometendo assim, a homeostase do sistema nervoso. Dentre essas, destaca-se a esclerose múltipla (EM), doença inflamatória crônica desmielinizante mais frequente que atinge o SNC (LEE; GOLD; LINKER, 2012; KARUSSIS, 2014; LERAY et al., 2016), sendo a desmielinização resultante de resposta autoimune (ALMEIDA et al., 2007).

Devido aos danos à bainha, a qual reveste as fibras nervosas, o carreamento dos impulsos nervosos entre o encéfalo e a medula espinhal sofre modificações na EM (COSTA et al., 2005). Assim, a neurotransmissão pode ficar comprometida, com prejuízo na condução das informações neuronais que controlam os movimentos conscientes e inconscientes do organismo (BERTOTTI; LENZI; PORTES, 2011).

Ante o exposto, a busca de uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos nesta doença são de suma relevância. Estudos sobre a EM avançam gradativamente e têm despertado um amplo interesse no meio científico, em decorrência de suas características crônico progressivas, que resultam em neurodegeneração, e por ainda não possuir etiologia nem cura conhecida (BAR-Or, et al., 2010; MILO; KAHANA, 2010; HAMMER; ZAGON; McLAUGHLIN, 2013). Estima-se a ocorrência de cerca de 2.5 milhões de casos de EM no mundo (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; ONTANEDA et al., 2017), sendo que populações que residem em áreas de clima temperado mostram-se mais susceptíveis a desenvolver a doença (JORDY; TILBERY; FAZZITO, 2008). A sua incidência é maior no sexo feminino, na faixa etária de 20-40 anos (TROJANO et al., 2012; HARBO; GOLD; TINTORE, 2013). Desse modo, ressalta-se que fatores genéticos e ambientais são relevantes para a epidemiologia da EM (HOWARD; TREVICK; YOUNGER, 2016; OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2017).

No Brasil, a prevalência da doença apresenta grandes variações entre as regiões, variando de 1,36 a 27,2 por 100.000 habitantes, dependo da localidade (da GAMA PEREIRA et al., 2015), sendo mais frequente no sul e sudeste do país (CARDOSO et al., 2006; BERTOTTI; LENZI; PORTES, 2011). É importante salientar que, a maior taxa de prevalência relatada do Brasil, é no Rio Grande do Sul, na cidade de Santa Maria, sendo de 27,2 casos de EM por 100.000 habitantes (FINKELSZTEJN et al., 2014).

Em adultos jovens representa a causa mais comum de incapacidade neurológica crônica não traumática, e muitas vezes, pode ocasionar déficits motores (fraqueza, fadiga e falta de equilíbrio), sensitivos (hipoestesias ou anestesias) e alterações visuais (REIPERT, 2004; BEN-ZACHARIA, 2011). O indivíduo com a doença pode apresentar uma diversidade de sinais e sintomas neurológicos, dependentes do local da lesão e do curso da doença, sendo este extensamente variável e imprevisível (KOUTSOURAKI; COSTA; BALOYANNIS, 2010; LEMOS et al., 2017).

De acordo com a sintomatologia e achados clínicos, existem quatro diferentes subtipos conhecidos para a EM: forma remitente-recorrente (RREM), forma progressiva secundária (PSEM), forma progressiva primária (PPEM) e a progressiva recorrente (PREM) (DAS UN, 2012). Cerca de 80%-85% dos casos, iniciam seu quadro clínico com a forma RREM, também conhecida como surto-remissão (SREM) (COMPSTON; COLES, 2008; BROWNLEE et al., 2017).

Embora a etiologia e a patogênese da EM ainda não estejam completamente elucidadas, é amplamente aceito que a mesma é mediada por uma resposta imune (BHAT; STEINMAN, 2009; GOODING, 2016). Acredita-se que os processos imunológicos durante as fases iniciais da doença incluem a formação de leucócitos auto-reativos na circulação periférica que, eventualmente, atravessam a barreira hematoencefálica (BHE). Esse rompimento da BHE, até então impermeável, facilita o recrutamento local de outras células inflamatórias no SNC gerando assim, os danos teciduais (PANKRATZ et al., 2016).

Ressalta-se, ainda, que a ativação de linfócitos T helper 1 (CD4+) auto-reativos e células Th17, bem como de outras células que constituem o sistema imune como: os linfócitos T citotóxicos (CD8+), células natural *killer* e linfócitos B medeiam a patogênese da EM, por conseguinte, cooperam para os danos neuronais (HAGMAN et al., 2015). Desse modo, essa enfermidade envolve mecanismos

inflamatórios mediados tanto pela imunidade inata quanto pela imunidade adaptativa, os quais contribuem para a desmielinização e neurodegeneração (YADAV et al., 2015).

Além disso, estudos recentes indicam que o estresse oxidativo possui um importante papel na patogênese da EM (LJUBISAVLJEVIC et al., 2013; POLACHINI et al., 2016). As espécies reativas de oxigênio (ERO) quando geradas em quantidades excessivas ou se, não apropriadamente controladas, são capazes de causar danos irreversíveis a importantes biomoléculas, tais como os lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos; uma vez que, possuem a capacidade de induzir alterações bioquímicas comprometendo a estrutura e a função celular (DJORDJEVIĆ; ZVEZDANOVIĆ; COSIĆ, 2008; OHL; TENBROCK; KIPP, 2016).

Vale destacar, ainda, que o SNC é extremamente suscetível ao estresse oxidativo (RADJA et al., 2017). Segundo WANG et al. (2014) a resposta inflamatória, característica das lesões presentes na doença, é precedida pelo estresse oxidativo, assim, esse pode ser o responsável por lesões desmielinizantes e consequente, neurodegeneração; além de contribuir para o desenvolvimento e progressão desse distúrbio neurodegenerativo.

Evidências também apontam que a disfunção colinérgica, devido aos processos inflamatórios que atingem a bainha de mielina, pode cooperar para as recaídas da doença (NIZRI et al., 2006). Neste contexto, Polachini et al. (2014) demonstraram que a atividade das colinesterases está aumentada em pacientes com EM, podendo estar associada com os processos inflamatórios presentes nesta doença.

Dados atuais da literatura demonstram que os componentes da sinalização colinérgica são expressos pelas células T e B, macrófagos, bem como pelas células dendríticas; desse modo, a atuação desse sistema na regulação das respostas inflamatórias e imunológicas é de grande relevância (FUJII et al., 2017). Ressalta-se, ainda, que a acetilcolina (ACh) é considerada um importante agente imunomodulador (KAWASHIMA; FUJI, 2003) e anti-inflamatório (OLIVEIRA et al., 2012).

É importante salientar também que a adenosina trifosfato (ATP) atua como um agente pró-inflamatório e seu produto adenosina possui propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias (DEAGLIO et al., 2007; GOMBAULT; BARON; COUILLIN, 2013). Dessa forma, há um grande número de pesquisas que

buscam compreender melhor os mecanismos de ação da sinalização purinérgica nas doenças que envolvem processos inflamatórios e imunológicos (SCHETINGER et al., 2007; SAFARZADEH et al., 2016).

Em estudos científicos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, encontrou-se uma alteração na atividade da acetilcolinesterase (AChE), em estruturas encefálicas de ratos submetidos ao modelo de desmielinização induzida por brometo de etídio, sendo que a atividade dessa enzima aumentou ou diminuiu conforme a estrutura analisada e o período da coleta (MAZZANTI et al., 2006; 2007; 2009). Além disso, a atividade das ectonucleotidases mostrou-se elevada em linfócitos e reduzida em plaquetas de pacientes com RREM (SPANEVELLO et al., 2010a; b). Ainda, recentes estudos do nosso laboratório de pesquisa demonstraram um aumento na atividade da AChE em linfócitos e sangue total, bem como, da butirilcolinesterase (BChE) no soro de pacientes com RREM (POLACHINI et al., 2014). Percebe-se, portanto, que há uma estreita relação entre alterações nas vias colinérgicas e purinérgicas e a ocorrência de processos inflamatórios sistêmicos associados a essa doença.

Considerando o importante papel dos biomarcadores de estresse oxidativo, bem como dos sistemas colinérgico e purinérgico em processos imunes e inflamatórios, além dos mecanismos ainda pouco compreendidos em relação à imunopatogênese na EM, tornou-se relevante avaliar o perfil oxidativo em amostras de sangue de pacientes com a doença. Além de, explanar e discutir, a possível influência dos sistemas colinérgico e purinérgico na EM. Desta forma, espera-se contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na destruição e reparo da bainha de mielina colaborando assim, com a prática clínica e terapêutica em benefício dos portadores desta afecção neurodegenerativa.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

3.1.1 Histórico

A história da esclerose múltipla (EM) advém de uma jornada que surge perante diversas observações, novas descobertas, além de resultados favoráveis em experimentos científicos (MILO; MILLER, 2014). O primeiro caso da doença foi revelado, em 1824, por Charles Prosper Ollivier d'Angers. Após um período de aproximadamente 14 anos, Robert Carswell e Jean Cruveilhier, considerados os pioneiros nas descrições patológicas da EM, iniciaram os primeiros relatos sobre uma nova doença (COVO, 2015). Assim, essa trajetória envolve muitos cientistas, entre eles o médico Friedrich Theodor von Frerichs, que em 1849, descreveu pela primeira vez, os sinais e sintomas clínicos da doença, que inicialmente, recebeu o nome de “esclerose cerebral" (GANESH; STAHNISCH, 2014; THORMANN; STEINBERG, 2014).

As primeiras relações coerentes entre a diversidade de sintomas e as características clínico-patológicas da doença, tiveram início com o francês Jean-Martin Charcot, em 1868 (MURRAY, 2009; GAFSON; GIOVANNONI; HAWKES, 2012). Esse reconheceu a presença de células inflamatórias, a perda da mielina, as alterações gliais, os danos axonais e ainda, modificações clínicas, como o declínio cognitivo (MILO; MILLER, 2014). Por meio de suas observações, tentou descrever os primeiros critérios diagnóstico para EM, conhecido como a tríade de Charcot, constituída por: nistagmo (movimentos rítmicos involuntários de um ou ambos os olhos), tremor de intenção (ataxia) e disartria (alterações na sucessão dos sons resultantes de um distúrbio no controle neuromuscular da fala) (PRZYBEK et al., 2015).

Inicialmente, Charcot reconheceu a doença como “esclerose em placas disseminadas”, já que pacientes com essa enfermidade apresentavam múltiplas áreas endurecidas semelhantes a cicatrizes presentes em vários locais do SNC. Somente mais tarde, ficou conhecida como “esclerose múltipla” (COSTA et al., 2005; GAFSON; GIOVANNONI; HAWKES, 2012; RANSOHOFF; HAFLER; LUCCHINETTI, 2015; RAPHAEL et al., 2015).

Em 1919, ocorre a primeira descrição da presença de anormalidades no líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes. Essa observação foi reforçada em 1930 por Thomas Rivers mediante a produção de um modelo experimental denominado encefalomielite autoimune experimental (EAE) (RANSOHOFF; HAFLER; LUCCHINETTI, 2015). Na década de 1940, Elvin Kabat, confirmou que havia um componente imunológico nesta doença, uma vez que por meio da técnica de eletroforese, encontrou uma elevação nos níveis de imunoglobulinas no LCR de sujeitos com EM (MOREIRA et al., 2002; COVO, 2015).

Em 1979, John Francis Kurtzke, criador da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS) e K. Hyllested descreveram, pela primeira vez, uma característica da epidemiologia da EM, considerando a doença de caráter transitório e de etiologia infecciosa (LAUER, 2014).

A primeira linha de tratamento para RREM foi introduzida somente em 1993 com o interferon β-1b sinalizando, a partir de então, um caminho para o desenvolvimento de uma diversidade de outros fármacos promissores, que atualmente, são utilizados para a terapêutica da doença (MILO; MILLER, 2014; RANSOHOFF; HAFLER; LUCCHINETTI, 2015). Além disso, nesta mesma década ocorreu a aprovação de dois outros fármacos, o interferon β-1a e logo após, o acetato de glatirâmer, ainda hoje bastante utilizados (COVO et al., 2015).

Os critérios diagnóstico da EM, foram primeiramente desenvolvidos por Poser em 1983, baseados em grande parte, nos resultados de testes adicionais, incluindo potenciais evocados visuais e análise do LCR (PRZYBEK et al., 2015). Em 2001, foram propostos pela primeira vez os critérios de McDonald, refletindo a descoberta diagnóstica pelo uso amplo da imagem da ressonância magnética (IRM). Esses critérios, utilizados para o diagnóstico de EM, foram revisados em 2005, com algumas retificações em 2010 (POLMAN et al., 2011; MILO; MILLER, 2014; COVO et al., 2015; PRZYBEK et al., 2015).

Ao longo do tempo, as pesquisas evoluíram bastante, entretanto, a jornada em busca de uma melhor compreensão sobre os mecanismos que desencadeiam e causam a evolução da doença permanece. Nesse cenário, pode-se concluir que a história da EM revela em seu curso uma diversidade de incertezas. Entretanto, um conhecimento científico mais amplo sobre essa enfermidade, ao longo dos anos, tem permitido progressos favoráveis na terapia para o cuidado dos pacientes com EM.

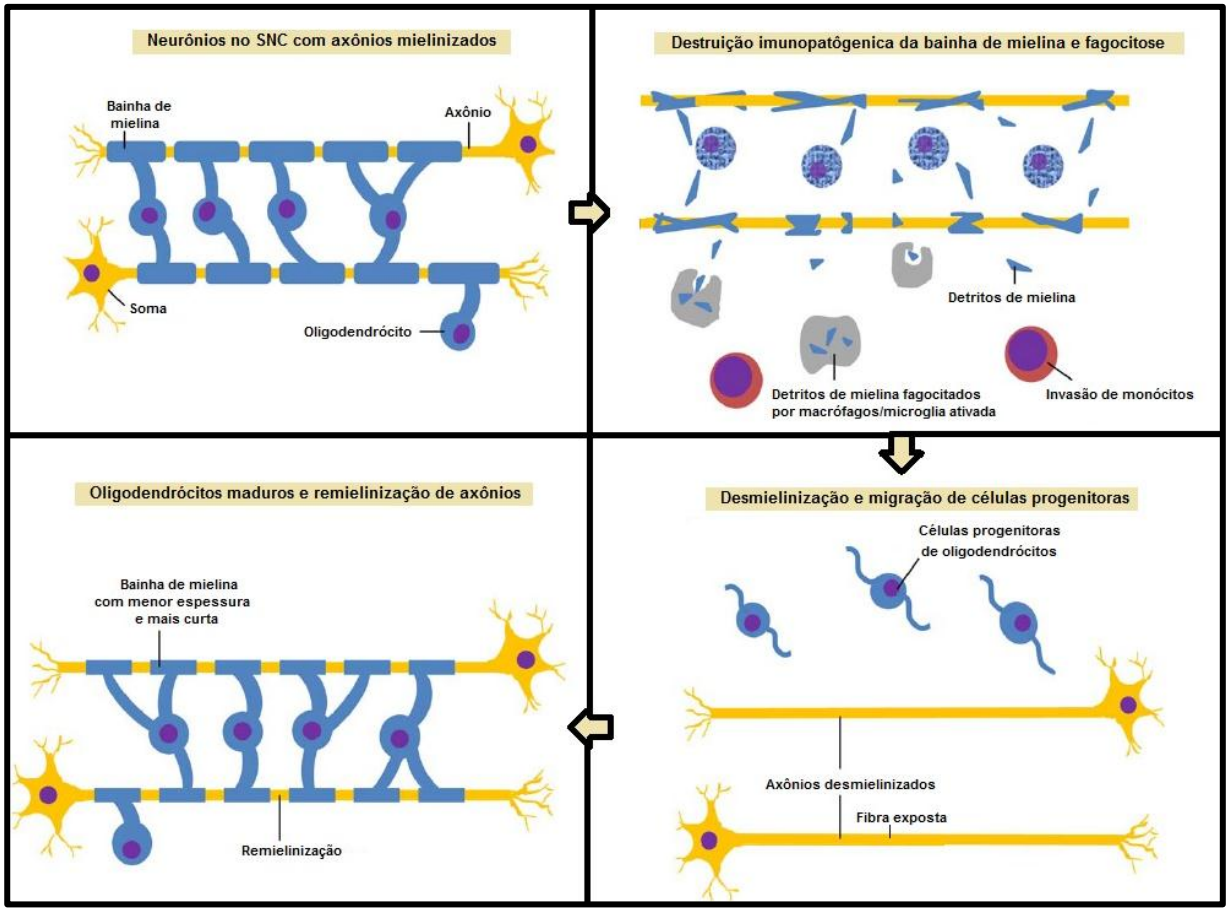
3.1.2 Conceito ou definição

A EM é uma doença crônica desmielinizante e neurodegenerativa do SNC (DARVESH et al., 2010; COMABELLA; KHOURY, 2012), apontada como a principal do grupo das afecções desmielinizantes (COSTA et al., 2005). Essas doenças são referidas como aquelas resultantes de lesões ou destruição das bainhas de mielina presente no SNC e/ou SNP (BUTTMANN; KAVERI; HARTUNG, 2013). Do mesmo modo, é considerada uma doença autoimune (DENDROU; FUGGER, 2017) por responder aos componentes da bainha de mielina, acompanhada de eventos neuroinflamatórios e neurodegenerativos no SNC (YANG; TAN; PIAO, 2016).

Além disso, a EM é uma das principais condições inflamatórias que afetam o SNC (LJUBISAVLJEVIC et al., 2013). A doença inicia como um processo inflamatório que induz as lesões focais na bainha de mielina (LASSMANN, 2017) atingindo tanto a substância branca quanto a substância cinzenta encefálica e medular (CARVALHO et al., 2014). Desse modo, é caracterizada por inflamação, desmielinização, e consequente dano ou perda axonal, remielinização, além de gliose em áreas localizadas do encéfalo e/ou medula espinhal (MILO; MILLER, 2014; OLSEN; AKIRAV, 2015). Algumas dessas principais modificações estão ilustradas na Figura 1, sendo que todas podem alterar a homeostase do sistema nervoso, e por conseguinte resultarem em comprometimentos tanto na função motora como sensorial (KARUSSIS, 2014).

Em decorrência da inflamação surgem as lesões focais que aparecem, principalmente, logo após os surtos e nos estágios iniciais da doença quando na forma progressiva (LASSMANN, 2017). A fase inicial da EM é caracterizada por recidivas e a fase tardia pelo aumento das incapacidades, sendo que as respostas do sistema imune durante o início da doença, e após a sua progressão também mostram-se diferenciadas (HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015). Essa enfermidade, geralmente, manifesta-se como uma desordem neurológica degenerativa progressiva, entretanto essa progressão, é amplamente variável ao longo tempo e entre casos específicos, assim, os déficits tendem a aumentarem; todavia há pacientes que não evoluem para condições debilitantes (SCOTT; LAFORET; YOU, 2013).

Figura 1 – Representação da bainha de mielina no SNC e as modificações que ocorrem durante o processo da esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de Olsen e Akirav (2015).

3.1.3 Epidemiologia

A EM é reconhecida mundialmente, entretanto, os relatos na literatura referentes as taxas de prevalência (número total de casos com a doença numa determinada população e durante um período específico) e de incidência (a proporção de novos casos durante um período de tempo definido) apresentam grandes variações entre as regiões e populações (WHO, 2008; KINGWELL et al., 2013).

Estudos estimam que haja em torno de 2,3 a 2,5 milhões de casos de EM no mundo (REINHARDT et al., 2014; RAPHAEL et al., 2015; BROLA et al., 2016; DENDROU; FUGGER, 2017) com uma prevalência de 30/100.000 habitantes (WHO, 2008; da GAMA PEREIRA et al., 2015). Ressalta-se ainda que, o oitavo maior gasto

em saúde nos Estados Unidos, no ano de 2015, foi com os medicamentos para o tratamento da EM (LEMOS et al., 2017).

Os indivíduos que residem em locais de maiores latitudes são mais susceptíveis ao surgimento da doença, bem como há uma maior prevalência na raça caucasiana (VASCONCELOS et al., 2016). Além disso, as taxas de incidência mostram-se superiores nas populações que vivem em regiões de clima frio ou temperado (MILO; KAHANA, 2010).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde e a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla, existem aproximadamente 35 mil pessoas com a doença (BRASIL, 2017). O Rio Grande do Sul é o segundo em número de internações hospitalares para o tratamento da doença (FINKELSZTEJN et al., 2009). Além disso, os custos gerados para os tratamentos aprovados no país, para a manutenção de um paciente com a doença são muito elevados (BERTOTTI; LENZI; PORTES, 2011) e figuram entre os 10 maiores orçamentos do Ministério da Saúde (FINKELSZTEJN et al., 2014).

Essa enfermidade é considerada a causa mais comuns de inabilidade neurológica crônica não traumática em adultos jovens (BROLA et al., 2016; CALVO-BARREIRO et al., 2017), em cerca de 2,7% a 5,4% dos pacientes, o primeiro surto ocorre antes dos 18 anos de idade (BELMAN et al., 2016). Existem poucos relatos na literatura de crianças com EM, estima-se uma incidência nesta população de 0,2 a 0,64/100.000 habitantes, bem como a prevalência da doença aumenta no sexo feminino após os 12 anos de idade (BELMAN et al., 2016).

Adultos jovens na faixa etária entre 20 - 40 anos de idade são os mais acometidos pela doença (COMABELLA; KHOURY, 2012; HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015), entretanto, ocasionalmente crianças e idosos desenvolvem essa afecção (GOLDENBERG et al., 2012). A incidência é maior no sexo feminino (GOLDENBERG, 2012; BROWNLEE et al., 2017), ainda sugere-se uma ascensão na taxa de incidência nas mulheres ao longo do tempo (KINGWELL et al., 2013). Essa ampliação, provavelmente, tem uma relação direta com os fatores hormonais, visto que os hormônios gonadais influenciam na atividade das células do sistema imune (MAGYARI, 2016).

Estudos relatam que os estrógenos, como o estradiol, em níveis reduzidos podem contribuir para a pró-inflamação; entretanto, o estriol, o hormônio da gravidez, em níveis elevados pode induzir uma alteração na resposta imune, com

modificações de uma resposta Th1 para Th2; por outro lado a testosterona parece ter um efeito anti-inflamatório (BOVE; CHITNIS, 2014; MILLER et al., 2014). A progesterona possui um efeito protetor no SNC, visto que opõe-se ao efeito tóxico do glutamato em caso de lesões, aumenta a síntese de mielina e também possui um efeito regulatório na resposta imune, minimizando o processo pró-inflamatório (XIN et al., 2015).

3.1.4 Etiologia e patogênese

A EM resulta da interação de fatores genéticos e ambientais (LAUER, 2014; CALVO-BARREIRO et al., 2017), bem como de condições epigenéticas (HUYNH; CASACCIA, 2013; KAUNZNER; AL-KAWAZ; GAUTHIER, 2017). Entre os fatores de risco ambientais destacam-se: imunizações e infecções virais, como a infecção prévia pelo vírus Epstein-Barr (EBV), estresse, deficiência de vitamina D e o tabagismo, além de dietas desiquilibradas (LAUER, 2014; VASCONCELOS et al., 2016; AMATO et al., 2017). Neste contexto, estudos relatam que os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D podem ter grande influência na EM (RUNIA; VAN PELT-GRAVESTEIJN; HINTZEN, 2012; SHOEMAKER; MOWRY, 2018), visto que, tanto no inverno quanto no verão, os pacientes que desencadeiam algum episódio de exacerbação da doença (surtos) apresentam níveis significativamente menores de vitamina D quando comparados com aqueles indivíduos sem recidivas da doença (BROLA et al., 2016).

A patogênese dessa afecção é complexa, e ainda hoje, os mecanismos específicos que a suscitam permanecem uma incógnita (LEMUS; WARRINGTON; RODRIGUEZ, 2018). Contudo, embora os fatores iniciais desencadeadores da EM ainda não sejam conhecidos, estudos têm demonstrado que os linfócitos T (CD4+ e CD8+), células B e os macrófagos aparecem entre os principais componentes dos infiltrados inflamatórios na EM, estando intimamente relacionados ao aparecimento de lesões desmielinizantes (JUNKER et al., 2007; FRISCHER et al., 2009; COMABELLA; KHOURY, 2012).

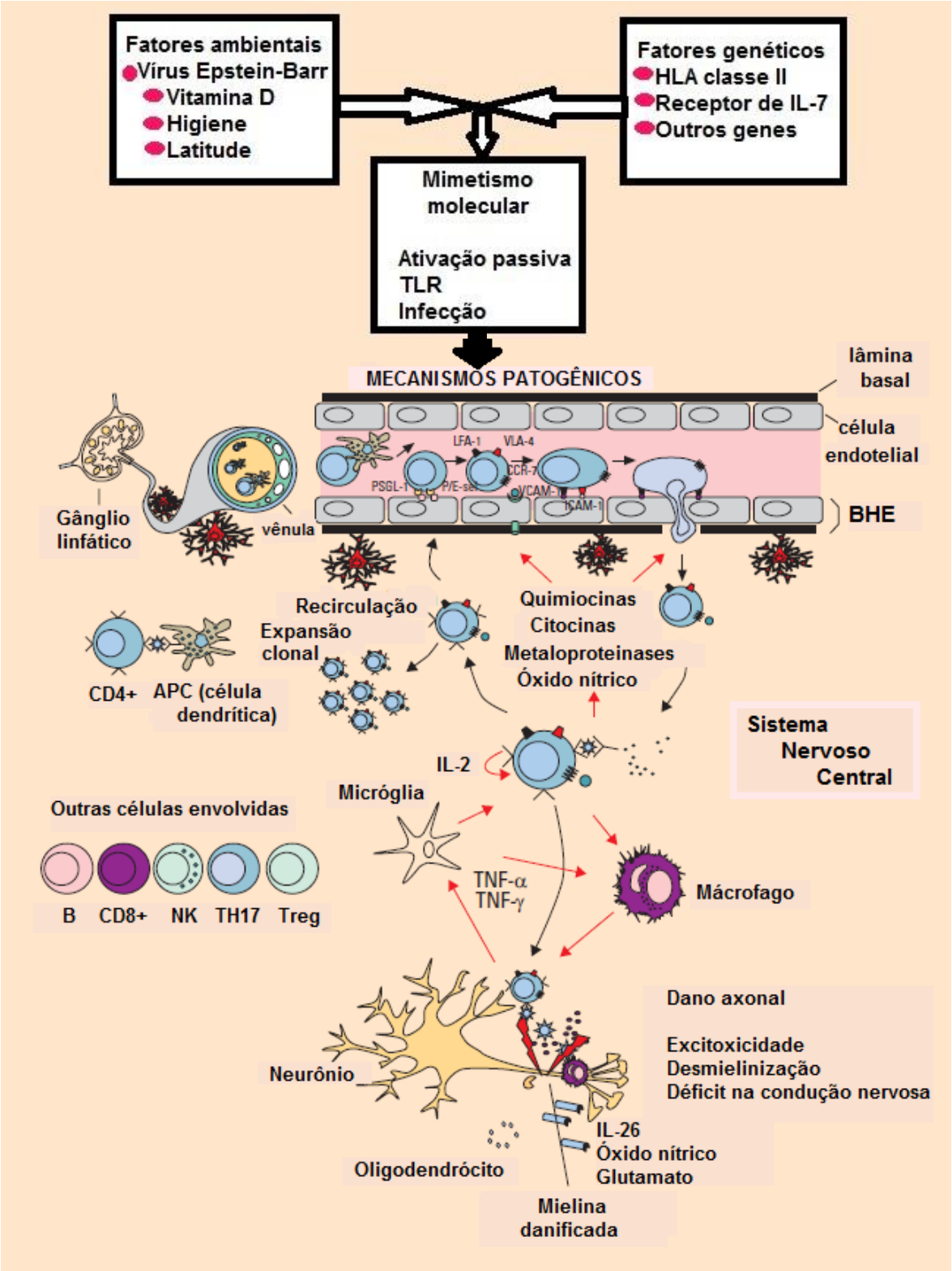
Ante o exposto, acredita-se que uma cascata de eventos ocorre, sendo que a doença tem início com a ativação periférica de linfócitos T, os quais uma vez ativados são capazes de atravessar a BHE, e já no SNC, esses sofrerão reativação, com secreção de mediadores pró-inflamatórios, os quais são responsáveis pela

ativação de macrófagos, linfócitos T, células B, e ativação de microglia. Dessa forma, mediadores citotóxicos, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), ERO, óxido nítrico são liberados induzindo a desmielinização, com consequente danos a oligodendrócitos e degeneração axonal (NEUHAUS; ARCHELOS; HARTUNG, 2003; CICCARELLI et al., 2015; CHOI; JUNG; SUH, 2017). Assim, a inflamação por meio da infiltração de macrófagos e células T, bem como ativação da microglia é associada a lesão tecidual ativa na EM (KUTZELNIGG; LASSMANN, 2014).

Em condições graves de inflamação, o suprimento de oxigênio pode ser reduzido abaixo de um limite crítico, devido ao alto consumo desse pelos infiltrados inflamatórios perivasculares em áreas do encéfalo e da medula espinhal, os quais já possuem um baixo fornecimento de oxigênio em condições fisiológicas, sendo que, na EM foram identificadas um aumento das lesões nessas áreas, consideradas importante para irrigação sanguínea cerebral (MAHAD; TRAPP; LASSMANN, 2015).

Ressalta-se, ainda, que os principais efetores da neuroinflamação são: os monócitos perivasculares e os macrófagos, bem como as células gliais, dentre elas a microglia e os astrócitos; uma vez que por meio da circulação, essas células migram para os locais de agressão celular e invadem esses sítios. A resposta neuroinflamatória crônica presente em doenças neurodegenerativas, como a EM, provoca uma ativação sustentada das células gliais com liberação de citocinas pró-inflamatórias podendo levar a toxicidade e morte celular, diferentemente da resposta aguda que tem o objetivo de limitar o dano tecidual e promover o reparo tecidual (YAMASAKI et al., 2014; BEAMER et al., 2016) (Figura 2).

Figura 2 – Fatores etiológicos e patogênicos envolvidos na esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de Quílez et al. (2011).

Abreviaturas: Antígeno leucocitário humano/*Human leukocyte antigen* (HLA); Receptores do tipo Toll/*Toll-like receptors* (TLR); Barreira hematoencefálica (BHE); célula apresentadora de antígeno (APC); Células natural *killer* (NK), Fator de necrose tumoral (TNF); Interleucina (IL); Célula T regulatória (Treg).

O processo de neurodegeneração na EM é decorrente de uma combinação de: inflamação, desmielinização primária com formação de cicatriz glial e neurodegeneração cortical, consideradas alterações específicas para essa doença; sendo que o dano oxidativo presente nas lesões corticais está associado com as agressões a oligodendrócitos e neurônios, afetando estrutura e função de axônios e dendritos (FISCHER et al., 2013). Além disso, a perda do suporte estrutural e trófico de mielina, devido a cronicidade das desmielinizações, pode possibilitar uma maior exposição a substâncias tóxicas, como os mediadores inflamação, ERO e de ferro nesses locais onde ocorreu esse prejuízo (ONTANEDA et al., 2017). Neste contexto, a inflamação, os danos axonais e neuronais, a desmielinização, bem como o estresse oxidativo e excitotoxicidade são mecanismos fisiopatológicos envolvidos tanto no início da doença quanto na sua progressão (LASSMANN; van HORSSEN; MAHAD, 2012).

3.1.5 Manifestações clínicas

O curso da doença é amplamente variável e imprevisível (GOLDENBERG, 2012), acompanhado de episódios repetidos de disfunção neurológica com remissão imprevisível (COSTA et al., 2005). Dessa forma, clinicamente, o indivíduo pode apresentar uma diversidade de manifestações clínicas, dentre elas: déficits motores (fraqueza, falta de equilíbrio, problemas na marcha) e sensitivos (hipo ou anestesias) e alterações esfincterianas (KANTARCI et al., 2005; BROWNLEE et al., 2017). Dentre os sintomas mais comuns, destacam-se: fadiga muscular crônica, síndromes dolorosas, espasticidade, alterações visuais (visão dupla), bem como déficits cognitivos, transtornos de humor e depressão (BEN-ZACHARIA, 2011; KES et al., 2013).

Segundo Johnen et al. (2017) a deficiência cognitiva afeta até 70% dos pacientes com EM, com consequente implicações negativas na qualidade de vida do indivíduo, visto que resulta em prejuízo nas suas atividades laborais e sociais e ainda, há uma maior chance do desenvolvimento de desordens psiquiátricas. O comprometimento das áreas cognitivas afeta, principalmente, as funções executivas, a memória e a velocidade de processamento. Além disso, a depressão, comum nesses pacientes (PATTI et al., 2011), também pode estar associada a esse desequilíbrio (MATTIOLI et al., 2012).

Pesquisas apontam diferenças nos déficits cognitivos dependente da forma de EM, sendo que pacientes com a PPEM apresentam problemas cognitivos mais severos do que os que possuem a forma remitente-recorrente; nesta última, forma mais branda da doença, apenas a velocidade de processamento da informação e a memória de trabalho parecem estar comprometidas (RUET et al., 2013).

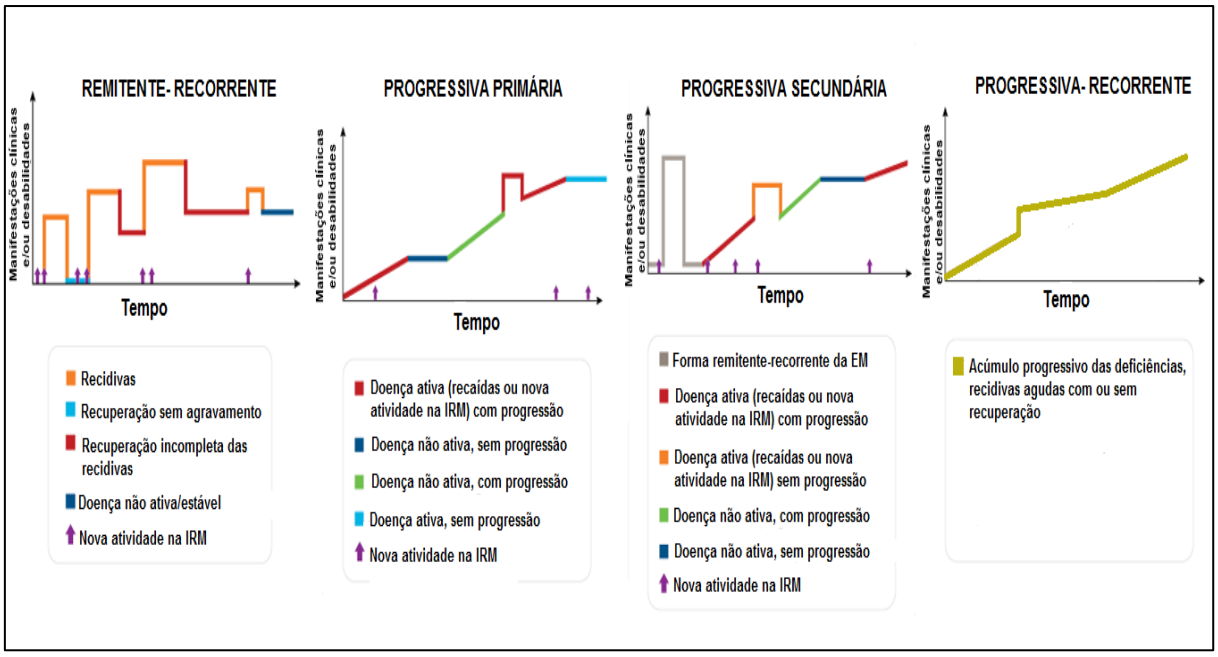
A fadiga, uma falta subjetiva de energia mental que o indivíduo e/ou cuidador percebe interferindo na execução das atividades habituais e desejadas, é um problema frequente em cerca de 75-90% dos pacientes com EM (ADONI, 2016). Ressalta-se, ainda, que comumente é relatado pelos pacientes, o comprometimento da marcha, 85% referem o problema e o consideram desafiador, uma vez que essa disfunção afeta diretamente a deambulação, repercutindo assim, em suas atividades diárias; além de, estar associado a gravidade da deficiência funcional neurológica (CAMEROTA et al., 2017).

3.1.6 Formas de EM

De acordo com a sintomatologia e achados clínicos, existem quatro diferentes subtipos conhecidos para a EM: forma remitente-recorrente (RREM), forma progressiva secundária (PSEM), forma progressiva primária (PPEM) e a progressiva-recorrente (PREM) (MALONI, 2013; RAPHAEL et al., 2015) (Figura 3).

Frequentemente, os pacientes iniciam o quadro clínico com a forma RREM, também conhecida como surto-remissão, caracterizada por surtos/recidivas (episódios de disfunção neurológicos, por no mínimo 24h, na ausência de febre ou infecção) seguidos por períodos de remissão, momento em que os sintomas regridem ou desaparecem (BROWNLEE, 2017). Esse período de remissão e estabilidade clínica entre as recidivas é dependente da remielinização (REIPERT, 2004). Aproximadamente 85% dos casos de EM são diagnosticados inicialmente com a forma RREM, sendo a forma mais prevalente (MILO; MILLER, 2014; RAPHAEL et al., 2015).

Figura 3 – Formas de esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de Lublin et al. (2014).

Figura retirada e adaptada do site da *National Multiple Sclerosis Society*. Disponível em: <https://www.nationalmssociety.org/What-is-MS/Types-of-MS>. Acesso em: 03. 11. 2017. Abreviaturas: Imagem por ressonância magnética (IRM); Esclerose múltipla (EM).

Cerca 65% dos pacientes com a RREM irão progredir para a PSEM, uma vez que com o passar dos anos a remielinização torna-se menos frequente, com aumento das lesões axonais, e consequente irreversibilidade dos danos neurológicos, gerando incapacidades mais graves (QUINTANA et al., 2012; JOHNEN et al., 2017). Dessa forma, a PSEM caracteriza-se pelo aumento dos déficits, considerando que ocorre progressão e acúmulo dos distúrbios neurológicos resultante das modificações na resposta inflamatória a longo prazo, bem como da neurodegeneração (GIOVANNONI, 2004; LJUBISAVLJEVIC et al., 2013). Além disso, aproximadamente 70% dos indivíduos desenvolvem essa progressão em 10 a 15 anos, após o início dos sintomas da forma RREM, por conseguinte, em torno de 1,3 milhões de pacientes no mundo possuem a forma progressiva da EM (ONTANEDA et al., 2017).

Em relação a PPEM, presente em 10-15% dos pacientes, revela-se desde o início, não sendo precedida por outras formas. É caracterizada por um aumento insidioso, lento e progressivo das deficiências neurológicas (BROWNLEE, 2017). Já a PREM manifesta-se em menos de 5% dos pacientes, é a menos frequente,

entretanto, progressiva desde o início, com crises intermitentes dos sintomas (GOLDENBERG, 2012). As manifestações clínicas não regridem após cada surto (SEIXAS et al., 2011).

Segundo Ontaneda et al. (2017) os pacientes que possuem as formas progressivas da doença, têm uma perda gradativa da funcionalidade, devido ao aumento irreversível das deficiências, destacando-se os prejuízos nas funções motoras. Neste cenário, alguns estudos têm associado a degeneração axonal e o dano neuronal como determinante para o surgimento dessas incapacidades (CORREALE; MELI; YSRRAELIT, 2006; LASSMAN, 2010).

Os estudos recentes demonstram que na fase RREM tem-se a ativação da microglia, a neuroinflamação, seguida do processo de desmielinização/remielinização na substância branca. Essa diferencia-se da fase progressiva, onde a desmielinização e a neurodegeneração ocorrem tanto na substância cinzenta quanto na branca, sendo acompanhada de manifestações clínicas neurológicas mais acentuadas e graves (FETISOVA et al., 2017). Ainda, pesquisas revelam que as lesões corticais tornam-se mais significantes, com a progressão da doença, visto que as incapacidades resultantes desses danos começam a aumentar, contudo, nos estágios iniciais as mesmas já estão presentes (KOLBER et al., 2015).

Além disso, atualmente, a EM pode ser dividida em três estágios, conforme as alterações patológicas: estágio inicial, no qual a lesão cerebral é dirigida por inflamação sistêmica; geralmente, presente na forma RREM; ao passo que na segunda etapa ocorre uma compartimentação da inflamação no encéfalo e/ou medula espinhal, e o último estágio, independe diretamente da inflamação; contudo, o tempo que o indivíduo possui a doença e a forma como desenvolveu-se vão estar relacionados a neurodegeneração (LASSMANN, 2017).

3.1.7 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico possuem muitas limitações e rotineiramente não são específicos para EM. Dessa forma, o diagnóstico e a classificação do subtipo clínico em que o paciente se encontra são de difícil precisão, não existindo um único método a ser utilizado (PRZYBEK et al., 2015). Em suma, o diagnóstico é baseado na apresentação clínica, sustentado pelos exames de neuroimagem (ressonância

magnética de crânio e medula) e, em determinados casos, faz-se a análise de LCR (detecção da presença de marcadores inflamatórios de bandas oligoclonais) bem como, realiza-se estudos de potenciais evocados (registro das respostas elétricas, revelando lesões clinicamente silenciosas) (FILLIPI; ROCCA, 2013; GARG; SMITH, 2015). No ambiente clínico, frequentemente utiliza-se alguns questionários e escalas de avaliações para verificar a progressão da doença, dentre elas, é bastante empregada a EDSS (KAUNZNER; AL-KAWAZ; GAUTHIER, 2017).

Além disso, há uma característica essencial a ser considerada para o diagnóstico dessa doença: a presença de lesões em distintos locais do SNC (disseminação espacial), que ocorrem em diferentes tempos (disseminação temporal), e ressaltam a necessidade de excluir diagnósticos alternativos (MILO; MILLER, 2014; DOMINGUES et al., 2017). Essas lesões desmielinizantes são detectadas tanto pelo exame clínico quanto por meio de IRM (POLMAN et al., 2011). A IRM tornou-se um importante instrumento para o diagnóstico, e principalmente, como um meio de investigar a progressão da doença, uma vez que a técnica permite realizar o acompanhamento do aumento no número de lesões, assim como a presença de atrofia cerebral (KAUNZNER; AL-KAWAZ; GAUTHIER, 2017).

Estudos relatam que ao receberem o diagnóstico de EM, é comum os pacientes já apresentarem algumas comorbidades, destacando-se a depressão; assim como, também foram observadas altas taxas de comorbidades físicas como: fibromialgia, doença intestinal inflamatória e epilepsia, com agravamento das mesmas com o passar dos anos de diagnóstico (MARRIE et al., 2016). Muitas vezes, devido a esses agravos, a expectativa de vida dos pacientes após o diagnóstico de EM, é em torno de 35 anos, além de ocorrer uma precocidade de 5 a 10 anos no óbito da maior parte desses indivíduos ao comparar-se com a população em geral (RUNIA; VAN PELT-GRAVESTEIJN; HINTZEN, 2012).

3.1.8 Tratamento

A terapêutica da EM envolve medidas farmacológicas e estratégias não-farmacológicas, tais como: reabilitação funcional, manutenção de um estilo de vida saudável, além de apoio psicossocial (BEN-ZACHARIA, 2011). O enfoque principal do tratamento é o controle das manifestações clínicas, visto que a cura para essa doença inexiste e os fármacos disponíveis ainda não são capazes de prevenir o

surgimento da doença (ALMEIDA et al., 2007). A terapia convencional pode incluir os fármacos imunomoduladores, dentre esses destaca-se o uso de alguns interferons-β, glicocorticoides e ainda a amantadina, indicado para redução da fadiga (GABY, 2013).

A metilprednisolona intravenosa é o glicocorticoide utilizado nas pulsoterapias como tratamento padrão para as recidivas/exacerbações agudas (surtos) em pacientes com RREM visando reduzir a neuroinflamação (WANG et al., 2014). Já no tratamento contínuo desses pacientes os fármacos comumente usados são: interferon-β e o acetato de glatirâmer, ambos injetáveis e considerados imunomoduladores (MILO; PANITCH, 2011).

Os interferons (IFNs)-β são citocinas que ocorrem naturalmente, sendo secretados pelas células imunes e possuem propriedades anti-inflamatórias (KIESEIER, 2011; GOLDENBERG, 2012). O acetato de glatirâmer, também conhecido como Copaxone®, é um polímero, constituído por quatro aminoácidos sintéticos (L-ácido glutâmico, L-alanina, L-lisina e L- tirosina) (KALA; MIRAVALLE; VOLLMER, 2011). Esse fármaco tem a função de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de competir com a proteína básica de mielina pela ligação de células apresentadoras de antígenos, bem como é capaz de promover a secreção de fatores neurotróficos (AHARONI, 2014).

Os fármacos imunomoduladores aprovados para o tratamento da EM buscam diminuir a frequência e a intensidade dos surtos ao longo dos anos, e por conseguinte reduzir o acúmulo de incapacidades durante a vida do paciente (FETISOVA et al., 2017). A maioria desses fármacos são autoinjetáveis, porém existem em infusão e também, alguns orais (GARG; SMITH, 2015).

É importante destacar que após o uso desses imunomoduladores injetáveis por via intramuscular ou subcutânea frequentemente ocorrem reações locais, incluindo dor, prurido e eritemas, além de outros efeitos adversos como febre, mialgia, fadiga (TILBERY et al., 2009). Desta forma, tem sido relevante o investimento em pesquisas para o desenvolvimento de um maior número de fármacos orais, já que esta via de administração causa menor desconforto, segundo relatos dos portadores da doença (KRETZSCHMAR; PELLKOFER; WEBER, 2016; EAGLE et al., 2017). Assim, em busca de medicamentos com menos efeitos adversos e visando qualidade de vida ao paciente com EM, novas drogas de

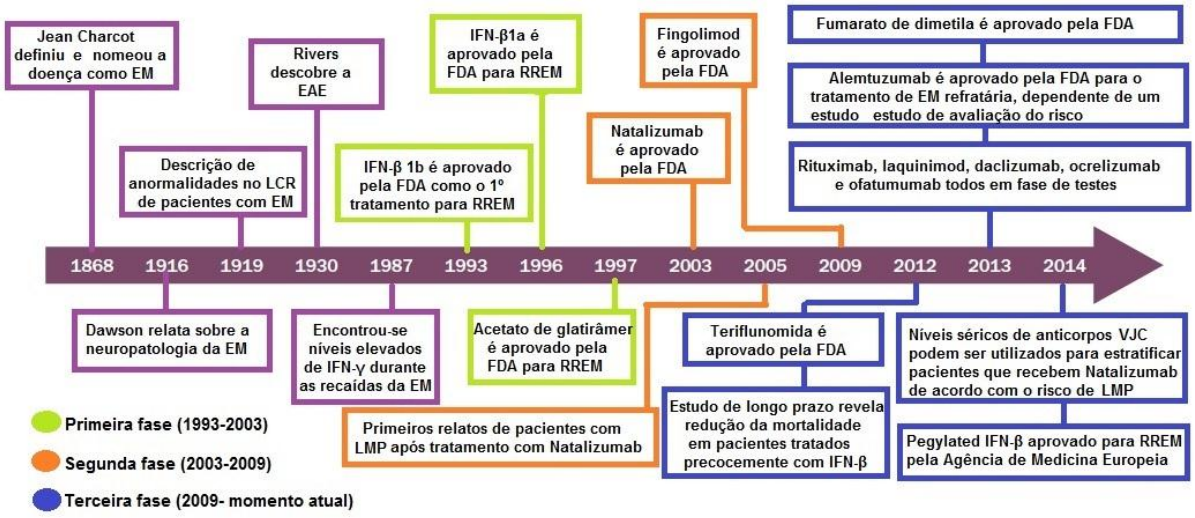
administração oral foram aprovadas, dentre elas: o fumarato de dimetila (Al-KHAMIS et al., 2016).

É crescente o número de fármacos disponíveis para o tratamento da EM que tentam reduzir o processo inflamatório e a agressão à mielina, e por conseguinte, diminuir o risco de novas recidivas (surtos) buscando assim, prevenir as incapacidades geradas pela EM a longo prazo (KAUNZNER; AL-KAWAZ; GAUTHIER, 2017). Contudo, até o momento, a experiência com imunoterapias na EM sugere a existência de uma disparidade entre a observação de infiltração de células do sistema imune e a perda progressiva de neurônios (DENDROU; FUGGER, 2017).

No Brasil, no início do ano de 2017, após algumas falhas com o uso dos fármacos IFN-β ou acetato de glâtiramer, incluiu-se ao tratamento da EM o fingolimod (nome comercial Gilenya), bem como a teriflunomida, sendo esses considerados uma segunda linha de tratamento e primeira linha de tratamento para EM, respectivamente (LEMOS et al., 2017).

Ante o exposto, de acordo com a sociedade nacional de EM, conforme dados do órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA), existem 16 medicamentos aprovados para o tratamento da EM, dando a impressão de que esta é uma doença totalmente tratável. No entanto, praticamente nenhum desses medicamentos consegue estagnar a doença, apenas visam retardar o seu curso (PLEMEL, 2018). Contudo, pode-se destacar o ocrelizumab, um anticorpo monoclonal humanizado recombinante que se liga a células B, o qual teve seu uso aprovado recentemente, após mostrar grande eficácia no controle da inflamação e progressão da doença (SABATINO; ZAMVIL; HAUSER, 2018). Na representação abaixo, Figura 4, faz-se uma explanação geral dos fármacos usados no tratamento da EM.

Figura 4 – Histórico referente a descoberta e o desenvolvimento de fármacos usados para o tratamento da esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de RANSOHOFF; HAFLER; LUCCHINETTI, 2015.

Abreviaturas: Esclerose múltipla (EM); Líquido cefalorraquidiano (LCR); Encefalomielite autoimune experimental (EAE); Interferon (IFN); Forma remitente-recorrente da EM (RREM); *Food and Drug Administration* (FDA); Leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP); vírus JC ou vírus John Cunningham (VJC).

3.2 RELAÇÃO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E SISTEMA IMUNE PERIFÉRICO COM A ESCLEROSE MÚLTIPLA

O sistema nervoso, nos mamíferos, é responsável pelas funções sensoriais e motoras, além de, recentemente, ser considerado necessário para o controle da imunidade inata e adaptativa (DALLI; SERHAN, 2017). Evidências indicam que as células imunes contribuem para a manutenção da homeostase do SNC e estão envolvidas no processo neuroinflamatório (XIE; YANG, 2015). Corroborando com esses achados, estudos atuais evidenciam a existência de comunicação, bem como de interação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico, visto que, no momento em que as células imunes são ativadas, ocorre a estimulação dos circuitos neuronais e esses, atuam regulando as respostas imunes (CHAVAN; PAVLOV; TRACEY, 2017).

O SNC é protegido pelo sistema imune em condições de homeostase, essa defesa é executada pelas células residentes nesse sistema, as quais irão auxiliar nas funções neurais, assim como essa proteção ocorre por outros tipos celulares, que permeiam o SNC em situações em que são requeridas (RANSOHOFF;

ENGELHARDT, 2012; LOUVEAU; HARRIS; KIPNIS, 2015). Assim, na EM os linfócitos T acabam atacando e destruindo a bainha de mielina que recobre o axônio, e desse modo, a função do SNC pode ser comprometida, com prejuízos na transmissão sináptica e consequente, comunicação entre os neurônios (EGWUAGU; LARKIN III, 2013).

Sob condições fisiológicas, a BHE, um importante componente de comunicação entre o encéfalo e a medula aos tecidos periféricos, protege o SNC, uma vez que impede a comunicação entre substâncias químicas presentes na circulação sanguínea e esse sistema (CORREALE; VILLA, 2009; HUPPERT et al., 2010; PRINZ; PRILLER, 2017). Em doenças que ocorre o rompimento dessa barreira, como na EM, as células da imunidade inata residentes no SNC ficam expostas a um novo meio, pois as células imunes situadas perifericamente adentram esse sistema, e conseguem acessar o parênquima encefálico (PRINZ; PRILLER, 2017). Ainda, os mediadores inflamatórios possuem um papel essencial no recrutamento dos leucócitos, bem como na reativação dessas células no SNC (KEBIR et al., 2007; KHADEMI et al., 2013).

Vale ressaltar, ainda, que esse bloqueio realizado pela BHE impede a interação entre os astrócitos e as células imunes periféricas; entretanto, em casos de danos ao SNC, que comprometem a integridade dessa barreira, o acesso das células do sistema imune periférico aos astrócitos é desbloqueado. Dessa maneira, as células T podem provocar alterações nos astrócitos, do mesmo modo que esses podem modificar o comportamento dos linfócitos T, resultando em atenuação ou exacerbação da doença (XIE; YANG, 2015).

Os linfócitos T têm um papel fundamental e bem estabelecido na patogênese da EM, considerando-se que as citocinas sintetizadas por essas células ou que atuam sobre as mesmas, tanto em humanos quanto em modelos experimentais animais, participam da iniciação e/ou progressão da doença (SÉNECAL et al., 2016). Nesse processo, participam da modulação das respostas imunes na EM, tanto as citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a destruição do tecidos, como as anti-inflamatórias, que atenuam as respostas inflamatórias e/ou promovem o reparo das lesões (EGWUAGU; LARKIN III, 2013).

Sabe-se que na interface entre SNC e SNP estão presentes as células mieloides (monócitos, neutrófilos, linfócitos T e B, dentre outras) e essas, possuem uma grande capacidade de plasticidade; dessa forma, quando o equilíbrio

homeostático do organismo é rompido, como por exemplo na EM, elas irão reagir a esse desequilíbrio, tornando-se reativas (PRINZ; PRILLER, 2017). Além disso, a progressão da doença sofre uma importante influência do equilíbrio de Th1/Th2, visto que esse é fundamental para a homeostase do sistema imune (XIM et al., 2015). Em doenças inflamatórias, a comunicação entre os sistemas nervoso e imune pode causar significantes modificações na função das células imunes (REARDON, 2016).

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO E A ESCLEROSE MÚLTIPLA

Diversos estudos têm relatado que o estresse oxidativo desempenha um importante papel na patogênese da EM (EMAMGHOLIPOUR et al., 2016). As ERO e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. Entretanto, o desequilíbrio entre a formação e a remoção dessas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante, chamado de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

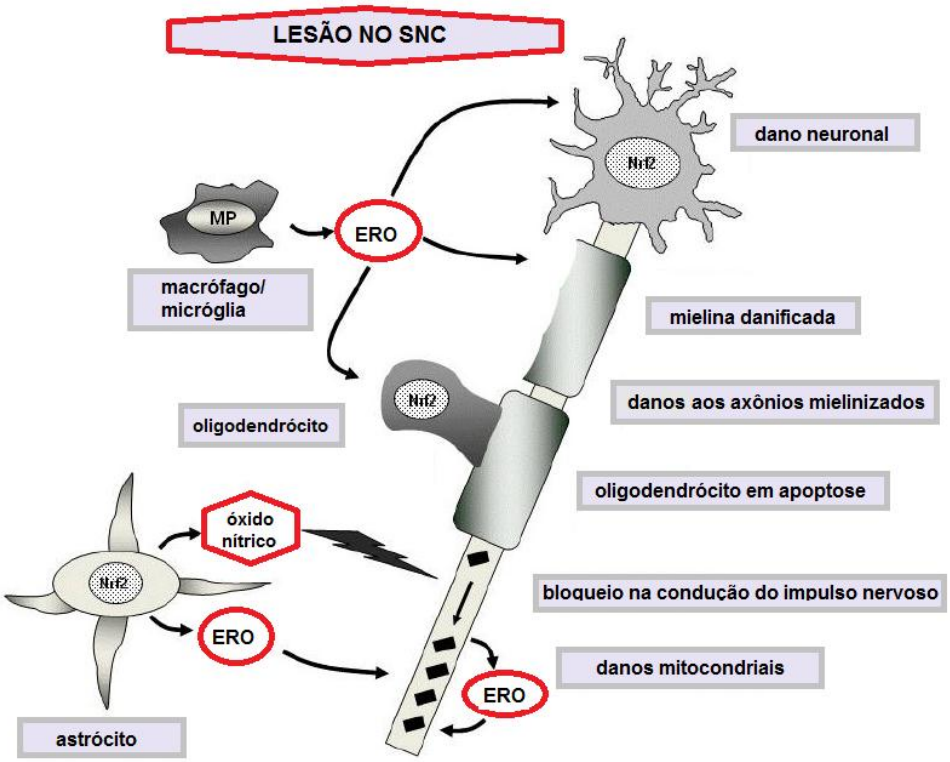
Dentre as ERO destaca-se: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1O_2$) (RUTKOWSKI et al., 2007). A presença de um elétron desemparelhado na última camada define a espécie como um radical (ADAMCZYK; NIEDZIELA; ADAMCZYK-SOWA, 2017).

É importante ressaltar que, as ERO possuem uma relevante função biológica, visto que são geradas pelas células do sistema imune e facilitam a fagocitose com o objetivo de destruir os agentes patogênicos, e por conseguinte, eliminar o agente agressor; contudo, na EM a produção dessas espécies sobrepõe-se a capacidade antioxidante, e dessa forma, contribui para a lesão celular (van HORSSEN et al., 2011).

Vale salientar, também, que devido a elevada taxa de utilização de oxigênio, as baixas concentrações de antioxidantes e ao alto teor de lipídios poli-insaturados, os quais são mais vulneráveis à oxidação, o SNC é particularmente suscetível ao dano oxidativo (MILLER et al., 2012). Assim, o estresse oxidativo contribui para a degeneração da bainha de mielina, que por muitas vezes, resulta em perdas axonais por atingir os oligodendrócitos, e para os danos neuronais, sendo que essas

alterações são características patológicas presentes na EM (MILLER; WACHOWICZ; MAJSTEREK, 2013; EMAMGHOLIPOUR et al., 2016). Ainda, evidências indicam que lesões oxidativas levam a danos mitocondriais e subsequente falha na produção de energia no neurônio induzindo a desmielinização e a neurodegeneração no SNC de maneira significativa (KUTZELNIGG; LASSMANN, 2014; HAIDER, 2015) (Figura 5).

Figura 5 – Mecanismos de danos oxidativos e citoproteção na lesão desmielinizante da esclerose múltipla no sistema nervoso central



Fonte: Adaptado de Lee, Gold e Linker (2012).

Abreviaturas: Sistema nervoso central (SNC); Espécies reativas de oxigênio (ERO); Mieloperoxidase (MP); Fator de transcrição citoprotetor (Nrf2).

Em relação a neutralização das espécies reativas, essa é realizada por meio da atividade enzimática ou de antioxidantes não enzimáticos (RUTKOWSKI et al., 2007). Dessa forma, o organismo possui dois sistemas antioxidantes que atuam de modo concomitante: um sistema endógeno enzimático e um sistema não enzimático que é composto por moléculas oriundas, principalmente da dieta (VALKO et al., 2007; MIRSHAFIEY; MOHSENZADEGAN, 2009). Relatos da literatura destacam que o uso de antioxidantes visando recuperar os danos mitocondriais em associação

com a terapia já utilizada pelos pacientes com EM, pode ser uma alternativa promissora, tendo em vista os efeitos anti-inflamatórios e protetores da neurodegeneração promovidos por esses compostos (FETISOVA et al., 2017).

Entre os antioxidantes enzimáticos pode-se destacar as enzimas superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O sistema composto por essas enzimas é considerado o mais eficiente para a defesa do organismo (BONNEFOY; DRAI; KOSTKA, 2002). A SOD é a principal responsável pela conversão de radicais superóxido a H_2O_2, por conseguinte desempenha um importante papel na detoxificação do organismo (LEE; GOLD; LINKER, 2012). Entretanto, para eficácia do sistema é necessária a ação da CAT na subsequente decomposição H_2O_2 em H_2O e O_2 (ORTIZ et al., 2013). É importante ressaltar que a detoxificação das ERO envolve um mecanismo de elevada sincronia em que as enzimas antioxidantes atuam de maneira cooperativa.

As defesas não enzimáticas, também são de fundamental importância para a célula no controle dos processos oxidativos, destacando-se o ácido ascórbico (vitaminas C), α-tocoferol (vitamina E) e os compostos orgânicos que contém grupos sulfidrila (SH), conhecidos como tiois (VALKO et al., 2007; RAJENDRAN et al., 2014).

O ácido ascórbico (vitamina C) apresenta propriedades antioxidantes protegendo várias moléculas contra o dano causado pelas ERO (BESLER; COMOĞLU; OKÇU, 2002). A vitamina C possui propriedades antioxidantes e ações imunomoduladoras protegendo várias moléculas dos danos causados pelas ERO (VILLACORTA; AZZI; ZINGG, 2007). Além disso, é considerada um nutriente de grande importância para o SNC, pois auxilia na manutenção da integridade, bem como das funções que ocorrem nesse sistema, como a maturação e diferenciação neuronal, estimula a formação da mielina nas células de Schwann, além de modular a neurotransmissão (KOCOT et al., 2017).

O alfa-tocoferol (vitamina E) está presente em todas as membranas biológicas e por meio da remoção dos radicais peroxil atua na prevenção da peroxidação, sendo considerado um importante inibidor da peroxidação lipídica em animais (KARG et al., 1999; KOCOT et al., 2017). É relevante salientar que a regeneração da vitamina E (alfa-tocoferol) é realizada pela vitamina C, sendo o ascorbato, fundamental na reciclagem desse antioxidante (VILLACORTA; AZZI; ZINGG, 2007). O ascorbato, uma forma reduzida da vitamina C, contribui para a homeostase dos

tecidos e órgãos, bem como age na reparação tecidual, além de exercer funções neuromodulatórias no encéfalo (MORETTI; FRAGA; RODRIGUES, 2017).

Também é importante destacar, entre os antioxidantes não enzimáticos, os tiois, visto que o desequilíbrio desses grupos, pode causar uma perda significativa da atividade biológica, uma vez que são responsáveis pela manutenção das reações de redução-oxidação (balanço redox), bem como atuam em processos de sinalização e transcrição celular (McBEAN et al., 2015). O tiol não proteico mais abundante em células animais é a glutationa na sua forma reduzida (GSH), um tripeptídeo composto por glicina, cisteína e ácido glutâmico (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003; MASELLA et al., 2005). De acordo com Choi et al. (2017) existe uma relação direta entre a redução da GSH e a atrofia cerebral nas fases progressivas da EM.

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo contribui para a degeneração da bainha de mielina. Assim, a manutenção dos níveis de vitamina D torna-se de grande importância na EM, já que essa vitamina auxilia na mielinização e remielinização, aumentando a diferenciação de células precursoras de oligodendrócitos, e também, ajuda a proteger o SNC dos danos mediados pelo excesso de ferro (HEIDKER; EMERSON; LEVINE, 2017). Ressalta-se, ainda, que a forma ativa da vitamina D diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto aumenta a secreção de citocinas anti-inflamatórias (HANWELL; BANWELL, 2011).

Além disso, na EM a vitamina D atua como um importante imunomodulador, envolvendo tanto os linfócitos T como B, além de poder exercer efeitos neuroprotetores e neurotróficos no SNC (PIERROT-DESEILLIGNY; SOUBERBIELLE, 2017). Estudos relatam que baixos níveis dessa vitamina são um fator de risco para o aparecimento da EM e causam maior susceptibilidade ao aparecimento dos surtos (BROLA et al., 2016; BETTENCOURT et al., 2017). Segundo Oliveira et al. (2017) a vitamina D pode ser utilizada para avaliação prognóstica em pacientes com EM, visto que a sua carência está associada com as incapacidades e progressão da doença em pacientes com a doença.

Há crescentes evidências de que o estresse oxidativo neuronal contribui para os danos gerados pela EM, sendo esse desequilíbrio, muitas vezes, resultante do alto teor de lipídios no tecido neural associado a produção exacerbada de radicais livres (MIR et al., 2014). As ERO podem causar alterações oxidativas nos lipídios, e assim, dar início a um processo conhecido como peroxidação lipídica, destruindo as

membranas celulares e/ou a bainha de mielina, áreas com grande quantidade de lipídios (ORTIZ et al., 2013).

A carbonilação proteica, observada na presença de ERO, é a adição não enzimática de grupos carbonilas, como aldeídos ou cetonas, em resíduos específicos de aminoácidos ligados as proteínas (MILLER et al., 2012). Essas modificações são irreversíveis e resultam em alterações e perda da função proteica, contribuindo para as lesões presentes em doenças neurodegenerativas (DALLE-DONE et al., 2006). Os níveis de carbonilação são considerados biomarcadores específicos para danos oxidativos a proteínas, sendo quantificáveis em neuropatologias como a EM (LAZARUS et al., 2015).

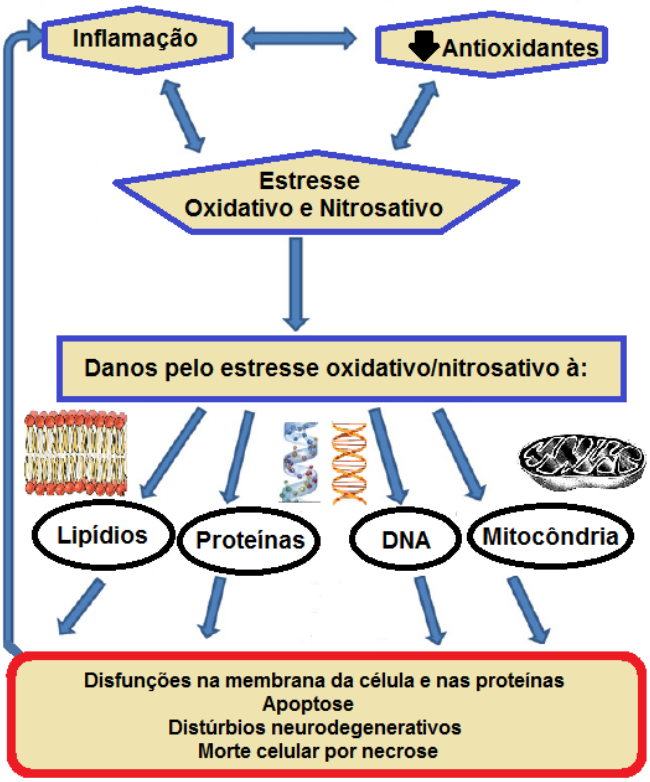
Segundo Adamczyk et al. (2017) na EM o desequilíbrio oxidante/antioxidante e bioenergético nos axônios, bem como acúmulo do elemento químico ferro no encéfalo, além da disfunção mitocondrial são relacionados aos processos redox. Vale salientar aqui que as alterações na homeostase mitocondrial devido a danos ao DNA e a apoptose são relevantes para a progressão da doença, pois contribuem para os processos neurodegenerativos (MAO; REDDY, 2010; RAJDA et al., 2017).

Ressalta-se, ainda, que existe uma estreita relação entre o estresse oxidativo e a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D, EC 4.2.1.24). A δ-ALA-D catalisa a condensação de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ALA) formando o porfobilinogênio. Ela atua na constituição dos grupos prostéticos de importantes proteínas fisiológicas como a hemoglobina e os citocromos (SASSA, 1998; LAYER et al., 2010). Além disso, a δ-ALA-D possui grupos tiois em seu centro ativo, que são facilmente oxidados, tornando-a extremamente vulnerável a agentes pró-oxidantes (FARINA et al., 2003).

A inibição dessa enzima leva ao desequilíbrio na biossíntese do heme e acúmulo do seu substrato na circulação sanguínea, além de existir uma relação entre alterações em sua atividade e o excesso de produção de ERO (AHAMED; SIDDIQUI, 2007; BAIERLE et al., 2014). Nesse cenário, sugeriu-se que essa enzima possa ser utilizada como um importante biomarcador de estresse oxidativo em patologias humanas (ROCHA et al., 2012).

Por fim, é importante salientar que distúrbio no estado redox (estresse oxidativo e exacerbada produção de ERO e ERN), disfunções mitocondriais, como defeitos no DNA e níveis insuficientes de vitamina D podem colaborar para o desenvolvimento e progressão da EM (MAO; REDDY, 2010; MAES et al., 2011; RAJDA et al., 2017) (Figura 6).

Figura 6 – Relação entre estresse oxidativo/nitrosativo, inflamação e neurodegeneração



Fonte: Adaptado de Maes et al. (2011).

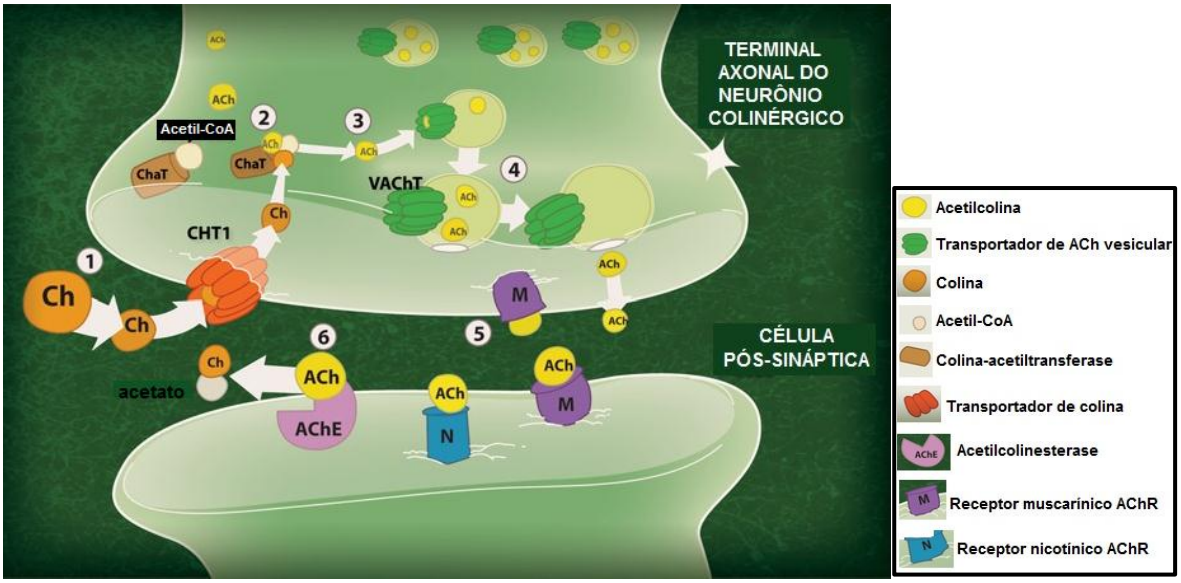
3.4 SISTEMA COLINÉRGICO E A ESCLEROSE MÚLTIPLA

Os principais componentes do sistema colinérgico incluem o neurotransmissor acetilcolina (ACh); a colina-acetiltransferase (ChAT); o transportador de colina (ChT); a acetilcolinesterase (AChE), que degrada a ACh; o transportador de acetilcolina vesicular (VAChT) e os receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) (KAWASHIMA et al., 2003; PAUL et al., 2015).

A ACh, molécula com importantes funções fisiológicas, é produzida, armazenada, liberada e interage com seus receptores da seguinte forma: (1) A colina é transportada para o terminal axônico pelo CHT1 e utilizada para a síntese de ACh. (2) No citoplasma das terminações nervosas ACh é sintetizada pela enzima ChAT, a partir de colina e acetil-coenzima A, e após a sua produção é estocada em vesículas sinápticas (3) pelo VAChT. (4) Com a chegada do impulso nervoso, as vesículas se fundem na membrana plasmática e liberam o neurotransmissor que, assim, pode ativar os receptores mAChR metabotrópicos e nAChR ionotrópicos

exercendo seus efeitos extracelulares (5). ACh é rapidamente degradada em acetato e colina (6) pela enzima AChE (LUCAS-MEUNIER et al., 2003; PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012; PRADO et al., 2013; RENARD; LUDOVIC, 2017), conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Esquema ilustrando o sistema colinérgico com uma visão geral da acetilcolina: síntese, armazenamento, liberação e interação com seus receptores



Fonte: Adaptado de Prado et al. (2013).

Abreviaturas: Acetilcolina (ACh); Transportador de ACh vesicular (VAChT); Colina (Ch); Transportador de colina (CHT1); Colina-acetiltransferase (ChAT); Acetilcolinesterase (AChE); Receptor muscarínico (M); Receptor nicotínico (N).

Além das funções clássicas do sistema colinérgico no SNC e SNP, relacionadas a neurotransmissão e neuromodulação colinérgica (KAWASHIMA; FUJII, 2000; WESSLER; KIRKPATRICK, 2008; PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012) também, atua na imunomodulação (KAWASHIMA; FUJII, 2004).

Está bem estabelecido na literatura que os componentes do sistema colinérgico são expressos nas células dendríticas, bem como em células localizadas perifericamente como as T e B, e nos macrófagos (FUJII et al., 2017; HOONER, 2017). Além disso, ao longo da história, estudos revelaram que a ACh, além do papel crucial que exerce para a fisiologia dos nematoides até complexos seres humanos como um neurotransmissor, também desempenha funções extremamente relevantes em sistemas colinérgicos não neuronais, uma vez que esta envolvida na

regulação da atividade dos linfócitos e das funções imunes inata e adaptativa (NIZRI; BRENNER, 2013; KAWASHIMA et al., 2015).

As pesquisas vêm demonstrando, ao longo dos anos, a existência de uma relação direta entre o sistema colinérgico e o sistema imune, por meio da via “anti-inflamatória colinérgica” (TRACEY, 2007; HAN; LI; HAO, 2017), que atua por meio da liberação ACh, com consequente supressão da síntese de citocinas e inibição do processo inflamatório (WANG; ZHOU; YAO, 2009; HOONER, 2017).

Ante o exposto, vale salientar que em doenças inflamatórias a atuação da ACh neuronal e não neuronal é fundamental (HAN; LI; HAO, 2017). Dessa forma, alterações nas funções da ACh no SNC e/ou periférico poderiam contribuir para o aumento do processo inflamatório e influenciar para a progressão da EM (TATA et al., 2014).

É bem estabelecido na literatura que as células T expressam tanto mAChR como nAChR, entretanto, esses receptores apresentam diferentes respostas ao serem ativados. Os receptores muscarínicos intensificam mediadores pró-inflamatórios, por outro lado os receptores nicotínicos exercem atividade anti-inflamatória (NIZRI et al., 2006; CARNEVALE; DE SIMONE; MINGHETTI, 2007; REALE et al., 2012). Além disso, tem sido observado que os pacientes com RREM apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias concomitante a baixos níveis de ACh no LCR e no soro (REALE et al., 2012).

A manutenção da homeostase imunológica sofre grande influência do sistema colinérgico não-neural presente nas células imunes (JIANG et al., 2017). A ativação de receptores do tipo α7 nicotínicos (α7nAChR) pode levar à inibição da proliferação de linfócitos, bem como da ativação de macrófagos e microglia (KALKMAN; FEUERBACH, 2016). Na EM existe uma relação direta entre a atividade de lesões desmielinizantes e as infiltrações de células T e B (FRISCHER et al., 2009).

A ACh liberada por células T regula a síntese de citocinas em células imunes por meio do seu efeito agonista nos α7nAChR, modulando assim, a produção e/ou diferenciação das células T (KAWASHIMA et al., 2015). Já a estimulação e produção de células B ocorre por meio da ativação desses receptores ou ainda, de outras subunidades de nAChR (SKOK et al., 2007). Assim, tem sido proposto que os agonistas do α7nAChR podem gerar efeitos benéficos em distúrbios neurológicos do SNC, como por exemplo a EM, uma vez que a inflamação é uma das característica

dessa doença e a ativação desses receptores desempenha um efeito anti-inflamatório (KALKMAN; FEUERBACH, 2016).

Outro importante aspecto a ser mencionado é que, além da ação dos receptores colinérgicos, as relevantes funções executadas pela ACh são dependentes da sua biodisponibilidade, que ocorrerá por meio da sua síntese e degradação (OLIVEIRA et al., 2012). O equilíbrio homeostático da ACh é efetuado por enzimas, conhecidas como colinesterases: a AChE (EC 3.1.1.7), uma colinesterase específica com alta afinidade pela ACh e a BChE (EC 3.1.1.8), uma colinesterase não específica para o substrato ACh ou pseudocolinesterase, capaz de hidrolisar uma grande variedade de ésteres de colina (KAWASHIMA; FUJII, 2000; REID; CHILUKURI; DARVESH, 2013). É importante destacar também que o aumento na atividade das colinesterases tem sido sugerido como marcador de inflamação sistêmica de baixo grau (DAS UN, 2007).

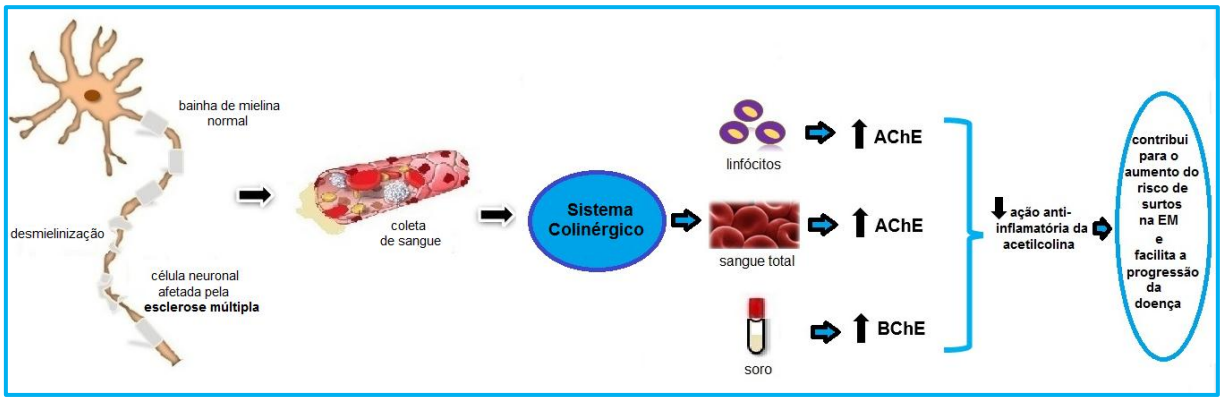
A AChE é amplamente distribuída, encontrando-se em maior concentração no encéfalo, na junção neuromuscular, bem como em células sanguíneas (ANGLISTER et al., 2008). Estudos observaram que a atividade da AChE encontra-se elevada em linfócitos, bem como em sangue total em algumas doenças autoimunes e inflamatórias, dentre elas a EM, supondo-se que AChE pode estar colaborando com as respostas imunes e pró-inflamatórias presentes nessas afecções (POLACHINI et al., 2014). Corroborando com esses achados, a inibição na atividade desta enzima pode ter efeitos benéficos na terapêutica da EM (PORCEL; MONTALBAN, 2006).

Os inibidores de AChE (IAChE) suprimem a proliferação de células T, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio das células que expressam o α7nAChR, assim podem reduzir a neuroinflamação e os déficits cognitivos na EM (BRENNER et al., 2008). Além disso, atualmente o uso de IAChE tem demonstrado melhorar a remielinização na EM, bem como os déficits cognitivos em ratos com EAE, o principal modelo de EM (FIELDS et al., 2017).

A BChE é sintetizada no fígado e expressa principalmente no plasma, entretanto, também está presente em órgãos como o encéfalo, pulmão e coração (LAMPÓN et al., 2012; POHANKA, 2013; ZIVKOVIC et al., 2017). Estudos reportam que a sua avaliação no soro dos pacientes, é relevante, principalmente nos casos de inflamação, visto que pode servir para o diagnóstico clínico, indicador prognóstico e ainda, para acompanhar a evolução clínica (SANTARPIA et al., 2013). Segundo

Zivkovic et al. (2015), independente da função hepática geral, a mensuração da atividade da BChE, pode auxiliar como um marcador diagnóstico para predizer uma inflamação sistêmica severa. Portanto, essa enzima pode ser considerada indicador inespecífico de resposta inflamatória sistêmica (ZIVKOVIC et al., 2017). A Figura 8 demonstra a relação do sistema colinérgico e a EM.

Figura 8 – Representação esquemática do sistema colinérgico e a esclerose múltipla em humanos



Fonte: Adaptado de Polachini et al. (2014).

Abreviaturas: Acetilcolinesterase (AChE); Butirilcolinesterase (BChE); Esclerose múltipla (EM).

Diferentes distúrbios do sistema nervoso, como em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, são caracterizados por disfunções nas vias colinérgicas que podem ser as responsáveis pelas deficiências cognitivas, motoras e comportamentais que estão presentes nessas enfermidades (TATA et al., 2014). Assim, é importante salientar que o controle da inflamação periférica pode contribuir para o controle da inflamação central, visto que na EM a inflamação exacerbada no encéfalo, mostrou-se presente não apenas nas recaídas da doença, mas em todas as formas da mesma, inclusive nas progressivas (FRISCHER et al., 2009).

Estudos recentes apontam que a ativação das células natural *killer* (NK) em doenças autoimunes, tais como a EM, pode ter um efeito protetor, visto que o sistema colinérgico presente nessas células intensificou a síntese de ACh em resposta à ativação autoimune (JIANG et al., 2017). Além disso, pesquisas atuais relatam que a sinalização colinérgica está envolvida em distúrbios que atingem a substância branca do SNC e a mesma pode estar associada a processos de desmielinização e declínios cognitivos (FIELDS et al., 2017).

Considerando o exposto, a identificação de novos fármacos visando regular os componentes do sistema colinérgico pode ser de grande relevância terapêutica clínica (GREIG; REALE; TATA, 2013; MATERA; TATA, 2014). Neste sentido, muitas pesquisas básicas e clínicas vêm sendo desenvolvidas na busca de uma maior compreensão sobre a função e farmacologia dos receptores α7nACh, visando o desenvolvimento de fármacos, e dessa maneira poder oferecer novos tratamentos para os pacientes com doenças que atingem o SNC e/ou que causam distúrbios inflamatórios (HOOVER, 2017).

3.5 SISTEMA PURINÉRGICO E A ESCLEROSE MÚLTIPLA

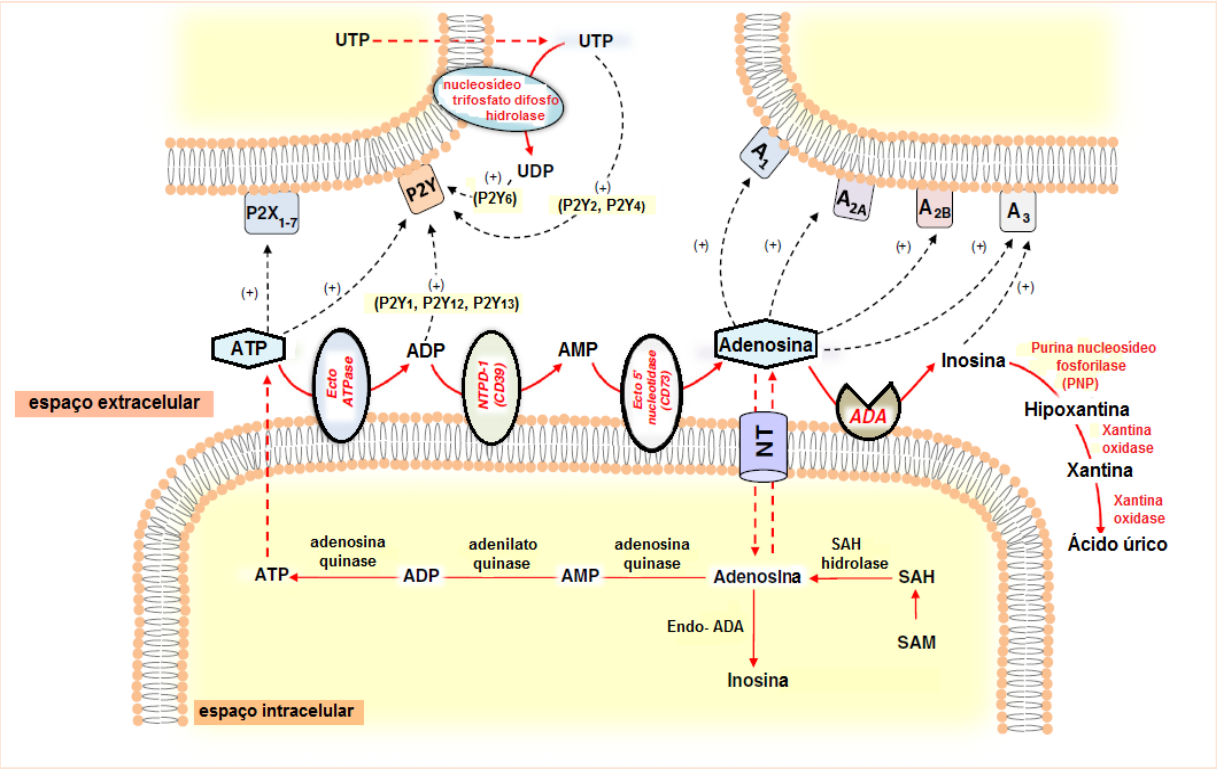
A via de sinalização purinérgica influencia no funcionamento adequado do sistema nervoso, uma vez que essa possui um importante papel na modulação de inúmeros processos, dentre eles, a neurodegeneração, neuroproteção e neuroregeneração. Dessa forma, é considerada essencial para a integração da atividade funcional entre neurônios, células gliais e vasculares no SNC (PUCHAŁOWICZ et al., 2014; BURNSTOCK, 2016), além de também estar envolvida na mediação das respostas imunes e inflamatórias (BOURS et al., 2006; SAFARZADEH et al., 2016).

Esse sistema de sinalização é constituído por nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares; receptores P1 e P2, também chamados purinoceptores, bem como, por uma cascata de enzimas responsáveis pelo controle da concentração das purinas, que localizam-se próximas à superfície celular. Dentre as enzimas destaca-se, as ectonucleotidases e a adenosina desaminase (ADA), as quais são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos extracelulares ATP, UTP, ADP, UDP, AMP e do nucleosídeo adenosina (ZIMMERMANN, 2006; BURNSTOK, 2014; CARDOSO et al., 2015).

A intensidade e/ou duração das ações dos nucleotídeos extracelulares e do respectivo nucleosídeo são controladas pelas ectonucleotidases, dentre essas destaca-se a ectonucleosídeo trifosfatodifosfohidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5), a ecto-5´-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73), a ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase (E-NPP) e a ecto-adenosina desaminase (ADA, EC 3.5.4.4) (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2007; YEGUTKIN, 2008; 2014). A atuação dessas enzimas tem início com a atividade da E-NTPDase, a qual catalisa a

hidrólise do ATP e do ADP formando AMP. Prosseguindo, ocorre a hidrólise da molécula do AMP, por meio da ação da enzima ecto-5'-nucleotidase, formando assim a adenosina, que é degradada pela ADA gerando inosina (ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012) (Figura 9).

Figura 9 – Visão geral mostrando os mecanismos responsáveis pelo controle da intensidade e/ou duração da transmissão purinérgica



Fonte: Adaptado de Antonioli et al. (2013).

Abreviaturas: uridina difosfato (UDT); uridina trifosfato (UTP); Adenosina trifosfato (ATP); Adenosina difosfato (ADP); Adenosina monofosfato (AMP); Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1 (NTPD-1); Adenosina desaminase (ADA); S-adenosil-L-homocisteína (SAH); S-adenosil-metionina (SAM); transportador de nucleosídeo (NT).

Os nucleotídeos de adenina, tais como ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina atuam como mensageiros extracelulares que ao se ligarem a receptores específicos provocam respostas biológicas em diferentes células (SÉVIGNY; MARTÍN-SATUÉ; PINTOR, 2015). Eles estão presentes, em praticamente, todos os órgãos e tecidos mediando uma diversidade de efeitos a partir de suas sinalizações (YEGUTKIN, 2014).

As duas classes de receptores purinérgicos atuam em diferentes moléculas: P1 (receptores de adenosina) e P2 (receptores de ATP e ADP). Ainda, segundo a

sua estrutura molecular, os receptores P2 são divididos em duas subfamílias: P2X e P2Y (BURNSTOCK, 2014). Os receptores P2X (ionotrópicos) são classificados em sete subtipos ($P2X_{1-7}$) e os P2Y (metabotrópicos) são divididos em oito subtipos ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) (BURNSTOCK, 2007; 2016).

É importante salientar aqui, que de acordo com a literatura, os principais subtipos envolvidos na EM são: $P2X_7$, $P2Y_1$, e ainda o GPR17 (receptor acoplado à proteína G específico de oligodendrócitos) (BURNSTOCK, 2016). Esse último é considerado um regulador da diferenciação das células progenitoras de oligodendrócitos, visto que a sua expressão prolongada inibe a diferenciação e maturação de oligodendrócitos tanto in vivo como in vitro (CHEN et al., 2009).

Outro importante aspecto é que a atividade elétrica que ocorre em células neuronais resulta na liberação de ATP, e esse mecanismo serve como um estímulo para a formação da mielina (AMADIO et al., 2010). Em altas concentrações o ATP pode contribuir para a inibição da mielinização e/ou remielinização, portanto os nucleotídeos extracelulares podem influenciar diretamente o surgimento das deficiências físicas e cognitivas na EM. Além disso, os receptores $P2X_7$ e $P2Y_{12}$ são expressos na superfície dos oligodendrócitos maduros, necessários para os processos de remielinização (PUCHAŁOWICZ et al., 2014).

Derivados das purinas, em especial o ATP e a adenosina, desempenham um papel importante na função de diversos órgãos (Di PERRI; LAGHI-PASINI, 1991; BOURS et al., 2006). O ATP, além de ser uma fonte de energia intracelular, também atua extracelularmente, sendo liberado em resposta a agressão celular (AMADIO et al., 2010). Além disso, os astrócitos modulam as concentrações extracelulares de ATP e adenosina, por conseguinte medeiam a neuroinflamação (BEAMER et al., 2016). Pesquisas recentes mostram que a inibição do $P2X_7R$ em monócitos, concomitante a uma maior expressão desses receptores nos astrócitos, pode contribuir para o início e propagação da neuroinflamação na EM, por meio da manutenção de mecanismos inflamatórios (AMADIO et al., 2017).

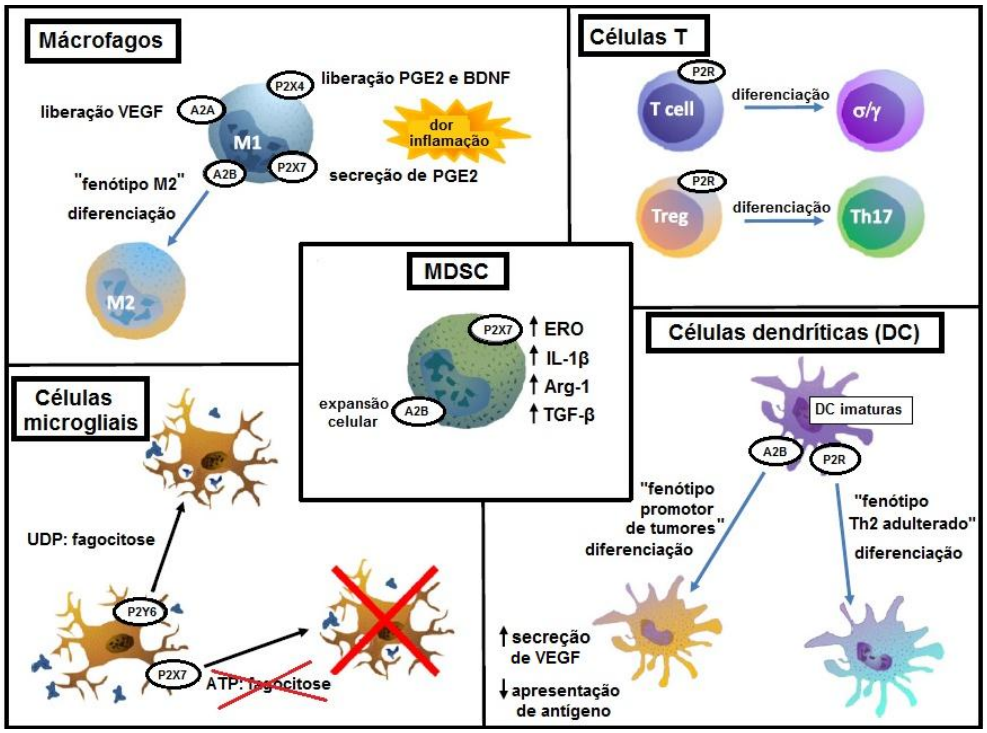
Em situações de incompatibilidade entre o fornecimento e a demanda de energética, a adenosina busca manter e restaurar a homeostase celular por meio de uma série de eventos, incluindo o aumento do fluxo sanguíneo local, melhoria no transporte e utilização de oxigênio, bem como mecanismos de proteção e redução dos gastos energéticos celulares (Di PERRI; LAGHI-PASINI, 1991). Assim, além da ação vasodilatadora dessa molécula, ela possui outras propriedades

eletrofisiológicas, anti-inflamatórias, cardioprotetoras e metabólicas (EIKVAR; KIRKEBØEN, 1998). Desse modo, os principais processos que sustentam a viabilidade e a adaptabilidade celular necessitam da ação da adenosina, sendo que essa está diretamente envolvida no mecanismo energético celular (ATP/ADP), no controle redox (NADH), também constitui a base com sua fração ribose (DNA e RNA), e ainda o controle epigenético por meio do doador de metila S-adenosil-homocisteína (SAH) é dependente de adenosina (CUNHA, 2016).

Existem quatro subtipos de receptores de adenosina A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3 (SÉVIGNY; MARTÍN-SATUÉ; PINTOR, 2015). Os efeitos dessa molécula são exercidos por meio dos seus receptores acoplados a proteína G, sendo A_1 e A_3 inibidores de adenilato ciclase, enquanto que A_{2A} e A_{2B} estimulam a produção de AMP cíclico (TRINCAVELLI; DANIELE; MARTINI, 2010). Estudos relatam que a adenosina extracelular por meio da estimulação de seus receptores, localizados na superfície das células imunes, interfere diretamente em muitos processos fisiológicos e patológicos da EM (SAFARZADEH et al., 2016). Os efeitos da ativação desses e outros receptores que constituem a sinalização purinérgica estão ilustrados na Figura 10.

Nos distúrbios degenerativos, como a EM, os receptores de adenosina podem ser importantes alvos terapêuticos, visto que atuam como neuromoduladores no SNC (GOMES et al., 2011), assim como, em leucócitos e células gliais controlam a liberação de citocinas, tais como, interleucinas e TNF-α. Os receptores A_1 tem sua ação predominante na membrana pré-sináptica, possuem efeito inibitório, e assim tendem a suprimir a atividade neural com ação neuroprotetora; no entanto, os receptores A_{2A} geralmente auxiliam na liberação do transmissor e na despolarização da membrana pós-sináptica, são excitatórios e aumentam a neurotoxicidade nas doenças neurodegenerativas (STONE et al., 2009; STOCKWELL; JAKOVA; CAYABYAB, 2017).

Figura 10 – Sinalização purinérgica: efeitos da ação dos nucleotídeos extracelulares sobre as células do sistema imune e suas implicações nas doenças. Essa Figura mostra que a ativação dos receptores purinérgicos, presentes nas células que constituem o sistema imune, em resposta a estimulação pelo ATP e/ou adenosina, desencadeia uma diversidade de respostas que influenciarão no processo saúde-doença



Fonte: Adaptado de Di Virgilio; Vuerich (2015).

Abreviaturas: Células supressoras derivadas de células mieloides (MDSC); Uridina difosfato (UDP); Adenosina trifosfato (ATP); Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Prostaglandina E2 (PGE2); Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); Espécies reativas de oxigênio (ERO); Interleucina (IL); Arginase-1(Arg-1); Fator de transformação do crescimento beta (TGF-β); Célula T regulatória (Treg).

Como já mencionado anteriormente, a concentração dos nucleotídeos extracelulares pode ser modulada pela atividade de enzimas ectonucleotidases. Assim, em relação as E-NTPDases (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012), a NTPDase 1 (CD39) é a predominante no sistema imune (MIZUMOTO et al., 2002). Uma vez que a mesma medeia efeitos imunomoduladores imediatos por meio da remoção do nucleotídeo; além de poder atuar juntamente com a ecto-5´-nucleotidase, presente na superfície de linfócitos, para produção da adenosina (BORSELLINO et al., 2007). Além disso, pesquisas apontam que esses mecanismos imunoregulatórios provocados pela NTPDase 1, ocorrem continuamente nos pacientes com EM, já que encontrou-se um aumento da atividade e expressão

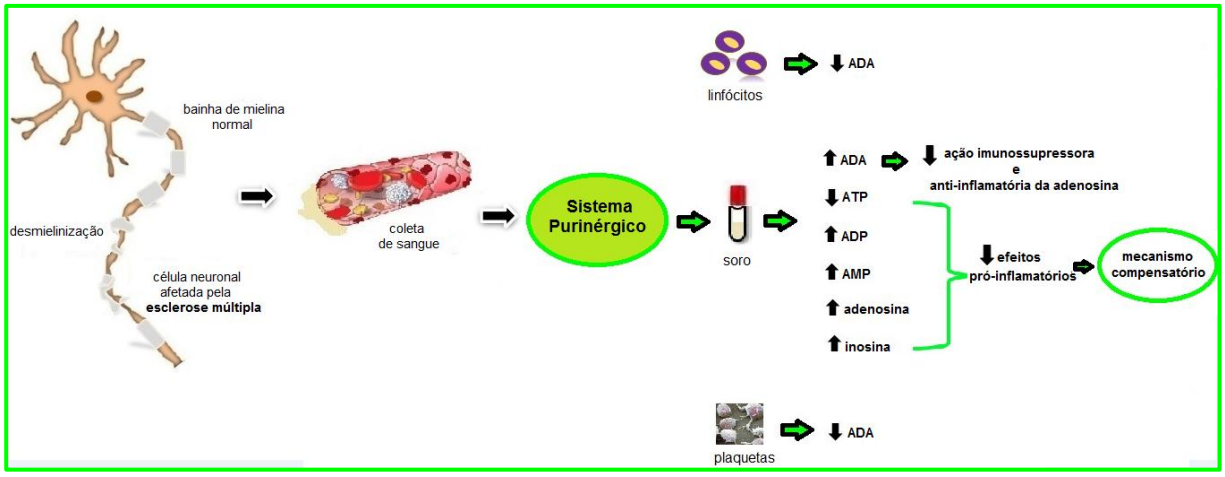
dessa enzima mesmo em fase de remissão da sintomatologia, o que foi reforçado após uso de metilprenidisolona intravenosa (MULS et al., 2015).

Já a ecto-5´-nucleotidase catalisa a desfosforilação de nucleotídeos monofosfatados, como AMP em seu nucleosídeo correspondente. É encontrada em vários tecidos, incluindo encéfalo, linfócitos e eritrócitos (HUNSUCKER; MITCHELL; SPYCHALA, 2005; BOROWIEC et al., 2006). A sua atividade é de extrema importância, tanto no encéfalo como na superfície do endotélio dos vasos sanguíneos, uma vez que influencia na produção do neuromodulador e regulador homeostático, a adenosina; assim como, contribui para a tromboregulação, mantendo a fluidez vascular (LANGER et al., 2008).

A ADA também é essencial para o metabolismo das purinas (CORDERO et al., 2001), sendo responsável pela absorção e degradação da adenosina para inosina, gerando uma rápida metabolização da adenosina no sangue e no líquido intersticial, e dessa forma, regulando a concentração extracelular dessa molécula (EIKVAR; KIRKEBØEN, 1998). Essa enzima é encontrada, principalmente, em órgãos e gânglios do sistema linfático, e além de regular os níveis de adenosina é fundamental para proliferação, maturação e função das células T (MAIUOLO et al., 2016).

A ação da ADA é fundamental para o desenvolvimento e manutenção do sistema imunitário (ZAVIALOV et al., 2010). Além disso, em humanos uma deficiência na ADA, por distúrbios genéticos, resulta em defeitos sistêmicos graves, em decorrência da imunodeficiência resultante da alteração na função e formação de células T, B e NK (GASPAR et al., 2011). Por fim, cumpre ressaltar que os pacientes com EM apresentam um aumento da atividade da ADA em soro, bem como uma elevação nos níveis de adenosina, entretanto ocorre inibição da atividade desta enzima em linfócitos e plaquetas; esses achados, podem significar uma tentativa de buscar a homeostase do organismo frente a neuroinflamação que ocorre continuamente na EM (Figura 11) (POLACHINI et al., 2014).

Figura 11 – Desenho esquemático do sistema purinérgico e a esclerose múltipla em humanos



Fonte: Adaptado de Polachini et al. (2014).

Abreviaturas: Adenosina desaminase (ADA); Adenosina trifosfato (ATP); Adenosina difosfato (ADP); Adenosina monofosfato (AMP).

Por fim, devido às diversas evidências mostrando as importantes implicações do excesso de produção de ERO concomitante a redução de antioxidantes endógenos, com consequente dano oxidativo, bem como dos sistemas colinérgico e purinérgico na EM. Esse estudo justificou-se pela necessidade de investigar possíveis marcadores envolvidos no equilíbrio oxidante/anti-oxidante e nos processos pró e/ou anti-inflamatórios na EM, assim como, esclarecer mecanismos envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias presentes nessa doença.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar marcadores do perfil oxidativo em sangue de pacientes com a forma remitente-recorrente da esclerose múltipla e revisar informações já publicadas na literatura científica referente a influência dos sistemas colinérgico e purinérico em humanos e modelos experimentais de EM.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em pacientes com a forma remitente-recorrente (surto-remissão) da EM e em indivíduos saudáveis:

- Avaliar a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) em sangue total;
- Analisar a atividade das enzimas do sistema antioxidante, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) em sangue total;
- Verificar o estado das defesas antioxidantes não enzimáticas por meio da determinação dos níveis de vitamina C, vitamina E, e de tiois não-proteicos (NPSH) em soro;
- Determinar marcadores de dano oxidativo, os níveis de peroxidação lipídica (TBARS), oxidação de proteínas (conteúdo carbonil) em soro, e danos ao DNA (ensaio cometa alcalino) em leucócitos;
- Quantificar os níveis de vitamina D em soro;
- Analisar parâmetros hematológicos;
- Revisar, analisar e discutir a literatura científica envolvendo EM e os sistemas colinérgico e purinérgico.

5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Evaluation of Delta-Aminolevulinic Dehydratase Activity, Oxidative Stress Biomarkers, and Vitamin D Levels in Patients with Multiple Sclerosis

Carla Roberta Nunes Polachini, Roselia Maria Spanevello, Daniela Zanini, Jucimara Baldissarelli, Luciane Belmonte Pereira, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Charles Elias Assmann, Margarete Dulce Bagatini, Vera Maria Morsch

Publicado no periódico: ***Neurotoxicity Research***
Neurotox Res (2016) 29:230–242. doi 10.1007/s12640-015-9584-2.

Evaluation of Delta-Aminolevulinic Dehydratase Activity, Oxidative Stress Biomarkers, and Vitamin D Levels in Patients with Multiple Sclerosis

Carla Roberta Nunes Polachini[1*], Roselia Maria Spanevello[2], Daniela Zanini[1], Jucimara Baldissarelli[1] Luciane Belmonte Pereira[1], Maria Rosa Chitolina Schetinger[1], Ivana Beatrice Mânica da Cruz[1,3,4], Charles Elias Assmann[4], Margarete Dulce Bagatini[5], Vera Maria Morsch[1*]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

[2] Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

[3] Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

[4] Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

[5] Curso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, Santa Catarina, SC, Brazil.

[*]Corresponding authors
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi,
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil
Tel/Fax:+55-55-3220-9557
E-mail addresses: carlinha_polachini@hotmail.com (Carla Roberta N. Polachini), veramorsch@gmail.com (Vera Maria M. Morsch)

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune neurological disorder of unknown etiology. Oxidative stress and alterations in vitamin D levels have been implicated in the pathophysiology of MS. The aim of this study was to investigate δ-aminolevulinate dehydratase (δ-ALA-D) activity as well as the levels of vitamin D, lipid peroxidation levels, carbonyl protein content, DNA damage, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and the vitamin C, vitamin E and non-protein thiol (NPSH) content in samples from patients with the relapsing-remitting form of MS (RRMS). The study population consisted of 29 RRMS patients and 29 healthy subjects. Twelve milliliters of blood was obtained from each individual and used for biochemical determinations. The results showed that δ-ALA-D and CAT activities were significantly increased, while SOD activity was decreased in the whole blood of RRMS patients compared to the control group ($P<0.05$). In addition, we observed a significant increase in lipid peroxidation, carbonyl protein levels in serum and damaged DNA in leucocytes in RRMS patients compared with the control group ($P<0.05$). Nonetheless, the levels of vitamin C, vitamin E, NPSH and vitamin D were significantly decreased in RRMS patients in relation to the healthy individuals ($P<0.05$). In conclusion, our results suggested that the increase in δ-ALA-D activity may be related to the inflammatory and immune process in MS in an attempt to maintain the cellular metabolism and reduce oxidative stress. Moreover, the alterations in the oxidant/antioxidant balance and lower vitamin D levels may contribute to the pathophysiology of MS.

Keywords: Multiple sclerosis, δ-Aminolevulinate dehydratase, Oxidative stress, Antioxidant, Vitamin D.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating neurodegenerative disease and is considered to be one of the main inflammatory conditions that affects the central nervous system (CNS) (Reynolds et al. 2011; Ljubisavljevic et al. 2013). MS is among the most common causes of non-traumatic chronic neurological disability in young adults that affects approximately 2.5 million people worldwide (Trapp and Nave 2008; Reinhardt et al. 2014). The majority of individuals, accounting for 80 to 85% of MS patients, exhibit the form of relapsing-remitting MS (RRMS), which is characterized by periods of exacerbation and remission of neurological symptoms (Ransohoff et al. 2015).

The etiological aspects of MS are still the major target of extensive studies; nonetheless, vitamin D deficiency currently appears to be the most robust modifiable risk factor for MS development, possibly because of the importance of this vitamin in neuroimmune functions (Pierrot-Deseilligny and Souberbielle 2013). Vitamin D receptors are presented in immune cells, and therefore, vitamin D is considered to be an immunomodulatory molecule (Correale et al. 2009; Gröber et al. 2013). It has been demonstrated that this vitamin is able to reduce the production of pro-inflammatory cytokines and increase the secretion of anti-inflammatory cytokines (Hanwell and Banwell 2011). The hypothesis that adequate vitamin D supplementation can contribute to the prevention of MS has been proposed (Ascherio et al. 2012); however, there are many questions involving the protective effect of this vitamin in the course of MS that are not completely understood yet.

In recent years, evidence has also suggested that reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress contribute to several mechanisms underlying the pathogenesis of MS lesions (Lassmann and van Horssen 2011). ROS in MS are generally derived from inflammatory cells and play a role in tissue injury, demyelization and axonal degeneration (van Horssen et al. 2011). Moreover, ROS are known to mediate the migration of monocytes, leading to a dysfunction in the blood-brain barrier (Mirshafiey and Mohsenzadegan 2009).

The ROS are produced continuously by cells as part of their metabolic processes (Fialkow et al. 2007). However, an imbalance in the oxidative/antioxidative status leads to a pro-oxidant process called oxidative stress that has been revealed to be the main contributor to neuroinflammation and neurodegeneration in diseases,

such as MS (Gonsette 2008; Ljubisavljevic et al. 2014). In this sense, this process can cause irreversible damage to important cell structures, resulting in modifications of lipids, proteins and DNA (Djordjević et al. 2008), leading to cell dysfunction.

The susceptibility of cells to oxidative damage depends on the state of their antioxidant defense, which is composed of endogenous enzymatic and non-enzymatic systems (Mirshafiey and Mohsenzadegan 2009). The enzymatic system is composed of a variety of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) (Miller et al. 2010). SOD is mainly responsible for the dismutation of superoxide radicals to hydrogen peroxide, which can be degraded subsequently by the enzyme CAT (Ortiz 2013).

Ascorbic acid (vitamin C), α-tocoferol (vitamin E) and organic compounds containing sulfhydryl groups (SH), called thiols, should be highlighted among the non-enzymatic antioxidants (Halliwell 2012). Vitamin C has antioxidant properties and an immunomodulatory action that protects various molecules of damage caused by ROS (Villacorta et al. 2007), while vitamin E also has important antioxidative and immunomodulatory properties (Løken-Amsrud et al. 2013). It is considered to be the first line of defense against lipid peroxidation (Pekmezci 2011). In addition, non-protein thiols (NPSH) are extremely important because they are involved in bioreduction and detoxification processes; thereby regulating intracellular redox homeostasis (Van Laer et al. 2013).

Furthermore, the enzyme delta aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D, EC 4.2.1.24) has been suggested to be a marker of oxidative stress in human pathologies (Rocha et al. 2012), wherein alterations in the activity of this enzyme are closely related to process oxidative stress. δ-ALA-D participates in heme biosynthesis and is essential for all aerobic organisms (Sassa et al. 1998). It is a thiol-dependent enzyme that can represent the circulating oxidative status better because it is highly sensitive to –SH oxidation by pro-oxidant elements (Paniz et al. 2007).

In this context, although many studies have demonstrated alterations in the oxidative stress parameters in MS, many of these data are controversial and the relation with disease progression is uncertain (Koch et al. 2006; van Horssen et al. 2011). In addition, considering that δ-ALA-D can be an important marker of oxidative stress and that there are no studies in the literature evaluating the role of this enzyme in MS, the aim of this study was to evaluate δ-ALA-D, CAT and SOD activities as well

as the lipid peroxidation, carbonyl protein, vitamin D, vitamin C, vitamin E, and NPSH levels and DNA damage in samples from patients with RRMS. These parameters were analyzed to obtain a better understanding of the role of δ-ALA-D and the oxidative process in the RRMS patients.

Materials and Methods

Study Population

This study included 58 volunteers who live in the city of Santa Maria, located in the central region of the state of the Rio Grande Sul (Brazil). The subjects were divided into two groups: MS patients (n= 29) and healthy individuals (n= 29) as a control group. The diagnosis of MS was based on the McDonald criteria (McDonald et al. 2001), and all patients had RRMS. Most patients were treated with a current immunosuppressive therapy such as interferon β and glatiramer acetate according to medical guidelines. The general patient characteristics are shown in Table 1. All of the subjects provided written informed consent to participate in this study, and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of the Santa Maria approved the protocol under number 26757114.4.0000.5346.

Blood Serum Collect

Twelve milliliters of blood was obtained from each patient and used for biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group. Blood samples were collected after an overnight fast by the venous puncture technique in Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with heparin and EDTA and without an anticoagulant system. For blood serum separation, the blood was centrifuged at 3500 rpm for 15 min at room temperature and the clot was discarded.

The serum was used to determine the vitamin D, vitamin C, vitamin E, NPSH and TBARS levels as well as the protein carbonyl content. Catalase and superoxide dismutase activities were determined using whole blood collected in citrated tubes and diluted to a ratio of 1:10 in a saline solution, whereas heparin was used as an anticoagulant agent for the determination of δ-ALA-D activity and the comet alkaline assay in leukocytes.

Determination of the Hematological Parameters

The erythrocyte quantification, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (VCM), mean corpuscular hemoglobin (HCM), mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM) and red cell distribution width (RDW) were determined in whole blood and analyzed with MEK-4100 automated equipment (Nihon Kohden, Japan).

δ-Aminolevulinic Dehydratase (δ-ALA-D) Enzyme Assay

δ-ALA-D activity was assayed in whole blood according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of porphobilinogen (PBG) formation. The reaction was started by adding δ-ALA to a final concentration of 2.4 mM in a phosphate buffered solution. A total of 200 μL of sample was incubated for 2 h at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 250 μL of trichloroacetic acid (TCA). The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of 6.1×10^4 M^{-1} for the Ehrlich-porphobilinogen salt. ALA-D activity was expressed as nmol porphobilinogen (PBG) mg^{-1} protein h^{-1}.

Determination of Lipid Peroxidation

The index of lipid peroxidation was estimated colorimetrically by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum as previously described (Jentzsch et al. 1996) with some modifications. In short, 200 μL of serum or standard (malondialdehyde [MDA] 0.03 mM) was added to the reaction mixture containing 1 mL of 1% ortho-phosphoric acid and 0.25 mL of an alkaline solution of thiobarbituric acid-TBA (final volume 2.0 mL) followed by 45 min of heating at 95ºC. After cooling, the serum and standard samples of MDA were read at 532 nm against the blank of the standard curve. The results are expressed as nmol MDA/mL of serum.

Quantification of the Protein Carbonyl Content

Protein oxidation was measured by an estimation of the carbonyl groups in serum performed according to the method of Levine et al. (1990), with slight modifications. This method is based on the quantification of the protein carbonyl by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in acidic medium. First, serum proteins were precipitated using 0.5 mL of 10% trichloracetic acid (TCA) from 1 mL of serum and were centrifuged at 3,500 rpm for 15 min, discarding the supernatant. One-half milliliter of 10 mmol/L DNPH in 2 mol/L HCl was added to precipitate the protein and was incubated at room temperature for 30 min. After incubation, 0.5 mL of 10% TCA was added to the protein precipitate and the tubes were centrifuged at 3500 rpm for 15 min. After discarding the supernatant, the precipitate was washed twice with 1 mL of ethanol/ethylacetate (1:1), centrifuging out the supernatant to remove the free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 mL of a protein dissolving solution (2 g sodium dodecyl sulfate and 50 mg ethylenediamine tetraacetic acid in 100 mL 80 mmol/L phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37ºC for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using a spectrophotometer at 370 nm against 2 mol/L HCl. The carbonyl content was calculated by using the molar extinction coefficient (21 x 10^3 L/mol cm), and the results were expressed as nanomoles of carbonyl per milligram of protein.

The Comet Alkaline Assay (Single Cell Gel Electrophoresis)

The comet assay has been developed as a method of detecting cellular DNA damage, and it is broadly used in a variety of fields, such as biological monitoring and genetic toxicology (McKelvey-Martin et al. 1993). The distance migrated by cellular DNA during electrophoresis directly reflects the extent of the DNA damage that is present. Therefore, we used this method to measure DNA damage in leukocytes isolated from RRMS patients and healthy subjects. The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. (1988) in accordance with the general guidelines for the use of the comet assay (Hartmann et al. 2003). Isolated human lymphocytes were suspended in 0.7% low-melting-point agarose and phosphate buffered saline (PBS) at 37 ºC and placed on microscopic slides with a layer of 1% agarose. Slides were incubated in an ice-cold lysis solution at 4 ºC for 1 h

to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. After the lysis procedure, slides were placed on a horizontal electrophoresis unit and covered with a fresh buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH>13) for 20 min at 4 °C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile-sites. This was followed by electrophoresis at 25 V, 300 mA, for 40 min at a constant temperature. The slides were then silver-stained, as described by Nadin et al. (2001). All of the steps, from sample collection to electrophoresis, were conducted under yellow light to minimize the possibility of cellular DNA damage. One-hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The comet parameters were analyzed as a percentage of DNA in the comet tail and tail moment. The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

SOD and CAT Activities

The superoxide dismutase activity in the whole blood measurement is based on the inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by Misra and Fridovich (1972). Briefly, the SOD activity was determined in a reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM) by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm. In this method, the SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide and the oxidation of adrenalin leads to the formation of adrenochrome, a colored product that is detected by the spectrophotometric reaction. One SOD unit was defined as the enzyme amount that inhibits the speed of oxidation of adrenalin by 50 %. The results are expressed in units of SOD/mg of protein.

CAT enzyme activity in whole blood was measured with the method of Aebi (1984) with slight modifications. For the determination of the CAT activity, a 20 µL aliquot of blood was added to a cuvette and spectrophotometric determination was started by the addition of 70 µL of freshly prepared 0.3 mol/L H_2O_2 in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) to give a final volume of 1 mL. The rate of the H_2O_2 reaction was monitored at 240 nm for 2 min at room temperature. The CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient (0.0436 cm^2/µmol), and the results were expressed as nmol/mg of protein.

Vitamin D Quantification

Vitamin D or 25-hydroxyvitamin D was measured in serum by radioimmunoassay (ADVIA Centaur kit commercial; Siemens Medical Solutions Diagnostic, Los Angeles, CA, USA). Serum 25(OH)D concentrations of <20 ng/mL were defined as 25(OH)D deficient, as well as being defined as insufficient when <30 ng/mL, and 25(OH)D >30 ng/mL was considered sufficient (Holick et al. 2011; Wacker and Holick 2013).

Vitamin C Levels

Vitamin C was estimated in serum as described by Jacques-Silva et al. (2001). The samples were deproteinized with trichloroacetic acid (TCA) 10%, using 0.5 mL of sample and 0.5 mL of TCA that was vortex-mixed for 15 s and submitted to centrifugation once more. An aliquot of 300 µL of supernatant was removed and incubated at 37ºC in medium containing 4.5 mg/mL dinitrophenylhydrazine hydrazine (DNPH), 0.6 mg/mL thiourea, 0.075 mg/mL $CuSO_4$, and 0.675 mol/L H_2SO_4. After 3 h, 1 mL of 65% H_2SO_4 was added and the samples were read at 520 nm. The content of ascorbic acid was calculated using a standard curve, following the same procedure used for the samples.

Vitamin E Content

Serum vitamin E was measured by a modified method of Hansen and Warwick (1969). A total of 140 µL of sample, 20 µL of butylated hydroxytoluene 10 mM (BHT), and 2.1 mL of ethanol solution (66%) were added to 140 µL of Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) in a covered tube. This mixture was vortex-mixed for 10 s and 3.5 mL of n-hexane was added and mixed for 1 min, followed by centrifugation at 3,500 rpm for 10 min. Next, 3 mL of the superior phase was transferred to fluorimeter cuvettes and vitamin E was measured in the fluorimeter (excitation: 295 nm; emission: 340 nm). The concentration was determined by the calibration curves with α-tocopherol, following the same procedure used for the samples.

NPSH *Determination*

NPSH was determined in serum as previously described by Ellman (1959), with minor modifications. Aliquots of 100 µL of serum were added to a phosphate buffer 0.3 mol/L (0.85 mL), pH 7.4. Then, the 10 mM 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 mL) was added and the reaction was read spectrophotometrically at 412 nm. A standard curve using cysteine was added to calculate the content of thiol groups in samples. The results are expressed as µmol NPSH/mL of serum.

Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using serum albumin as a standard.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically with Student's *t*-test for independent samples. Correlations between parameters were performed by Pearson's correlation. Differences were considered significant when $P<0.05$. All data were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM).

Results

This study consisted of 29 subjects with RRMS (19 women, aged 18-60 years; 10 men, aged 13-58 years) and 29 controls (20 women, aged 22-58 years; 9 men, aged 23–52 years). The general characteristics of the study participants are shown in Table 1. All of the patients involved in this study had the RRMS form, but none of them was a smoker or had a family history of MS. The treatment used for the majority of the female patients was glatiramer acetate, and they were diagnosed for the first time with MS approximately 10 years previously.

The hematological parameters of RRMS patients and control group are shown in Table 2. All of the individuals showed a hemogram compatible with their age and

gender in accordance with reference values. In the present study, we analyzed the number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, and hematological indices (i.e., VCM, HCM, CHCM, and RDW). No significant differences were found in any parameter between RRMS patients and healthy individuals.

The results of our study indicated, for the first time in the literature, that RRMS patients show alterations in δ-ALA-D activity. As can be observed in Figure 1, statistical analysis revealed a significant increase in the δ-ALA-D activity in the whole blood of the RRMS patients (96.7%) compared with healthy individuals ($P < 0.0001$).

Figures 2, 3 and 4 show the results obtained for the oxidative stress parameters, such as the lipid peroxidation, protein carbonyl and comet assay, respectively. As can be observed, the lipid peroxidation estimated by the TBARS levels was significantly increased in the serum of RRMS patients (49.9%) compared with the healthy group (Fig. 2, $P<0.0001$). Similar results were obtained in relation the protein oxidation determined by the protein carbonyl content in serum. The protein carbonyl content was also significantly increased in serum from RRMS patients (19.3%) in relation to the control group (Fig. 3, $P<0.05$). The comet image of blood cells showed different damage levels (Fig. 4a). In addition, as seen in Figure 4b, the RRMS patients presented significantly higher DNA damage (33.1%) compared to the control group ($P<0.001$).

Table 3 describes the activity of δ-ALA-D and its correlation with oxidative stress parameters in RRMS patients. As can be observed, the δ-ALA-D activity was inversely correlated with the TBARS levels in RRMS patients (Pearson r: -0.420, $P<0.05$). No statistically significant difference was found for the correlation between δ-ALA-D activity and Carbonyl protein levels (Pearson r: -0.381, $P=0.107$). However, the activity of the ALA-D enzyme demonstrated a significant positive correlation with SOD (Pearson r: 0.535, $P<0.05$) and CAT activities (Pearson r: 0.560, $P<0.05$). These findings show a correlation between the increase in the activity of this enzyme and the decrease in markers of oxidative damage in RRMS patients.

The next set of experiments was performed to analyze the antioxidant enzyme status in whole blood in RRMS patients. Figure 5 shows that SOD activity was significantly decreased in whole blood from MS patients (25.7%) compared with the healthy subjects (Fig. 5a, $P<0.001$). On the other hand, we found a significant increase in CAT activity in the whole blood of RRMS patients (10.7%) in relation to the control group (Fig. 5b, $P<0.05$).

In addition, our results also showed alterations in the non-enzymatic antioxidant parameters in serum from MS patients. The levels of vitamin C and vitamin E in serum are shown in Figure 6 for vitamin C (6a) and E (6b). We found an inhibition of 54.4% for vitamin C and 51% for vitamin E in the serum of RRMS patients compared with the control group ($P<0.0001$). Moreover, the NPSH levels were significantly decreased in the serum from RRMS patients (9.9%) compared with the healthy subjects (Fig. 6c, $P<0.001$).

In the present study, the vitamin D content was significantly decreased in the serum from RRMS patients (37.4%) compared with the control group (Fig. 7, $P<0.05$).

Discussion

In recent years, several studies concerned with the relation between oxidative stress and MS have been reported, and this topic is considered to be of great clinical relevance for MS (Ljubisavljevic et al. 2013; Friese et al. 2014). In line with this, researchers have suggested that, in MS, excess ROS are responsible for leukocyte migration and cause mitochondrial dysfunction (Lee et al. 2012). Increasing evidence links the onset of new outbreaks in MS to the ROS increase, with subsequent oxidative damage (van Horssen et al. 2008). Apart from the possible involvement of stress in MS, another important point is the activity of the enzyme δ-ALA-D in this disease. δ-ALA-D, together with other oxidative stress biomarkers, can perform a key role as a marker of oxidative stress and faulty metabolic processes (Valentini et al. 2008).

Previous investigations, including those of our research group, have reported a reduction in δ-ALA-D activity accompanied by changes in the hemoglobin levels in individuals diagnosed with chronic inflammatory diseases, such as type 2 diabetes mellitus (Souza et al. 2007) and lung cancer (Zanini et al. 2014). Nonetheless, it is important to note that, in the present study, we verified a significant increase in δ-ALA-D activity in whole blood from RRMS patients (Fig. 1). This increase may be due to the high demand of heme groups in an attempt to maintain erythropoiesis under normal conditions since in the presence of chronic inflammatory processes, there is an increase of pro-inflammatory cytokines with the consequent reduction of

erythropoietin (Han X et al. 2011). In fact, we observed that the patients involved in this study did not present significant differences in the blood parameter levels compared with the control group (Table 2).

Corroborating this hypothesis, we recently demonstrated that the pro-inflammatory cytokine levels, such as IL-1, IL-6, TNF-α and IFN-γ, are increased in the serum of RRMS patients (Polachini et al. 2014). Furthermore, Johansson and Strandberg (1972) reported higher δ-ALA-D activity in rheumatoid arthritis patients. Taken together, these findings demonstrated that the increase in the activity of this enzyme also may be related to the autoimmune process, which is present in both diseases. Reinforcing this line of reasoning, there was no change in δ-ALA-D activity in whole blood when tested *in vitro* in the presence of potential plasma concentrations of the drugs that are used to treat RRMS patients, i.e., glatiramer acetate and interferon β (data not shown). In this context, these findings support the argument that it is the pathological condition that generates the alterations in δ-ALA-D activity.

Another important aspect to be discussed is that the increase in δ-ALA-D activity found in this study could be contributing to the reduced oxidative damage by the accumulation of substrate 5-Aminolevulinic acid (ALA) since the accumulation of ALA has been associated with the overproduction of ROS (Rocha et al. 2003). Thus, we can speculate that the increase in δ-ALA-D activity can be due to excess ALA because it is a precursor for the synthesis of heme, cytochrome and vitamin B_{12} (Kang et al. 2012). Evidence has suggested that the demand for vitamin B_{12} might be an increase in recurrent myelin repair processes or chronic immune reactions in MS (McCaddon 2013). In addition, the myelin expresses the pathway of heme synthesis (Morelli et al. 2012). Therefore, we suggest that enhanced δ-ALA-D activity can be beneficial in this disease, contributing to the balance of metabolic processes and reducing oxidative stress.

Thus, to investigate the existence of damage, TBARS and carbonyl protein levels were evaluated in serum from RRMS patients. We observed a significant increase in both parameters compared with the control group (Figs. 2 and 3). Similar results were obtained in previous studies that also confirmed significantly increased lipid peroxidation and protein carbonyls in patients with MS (Sadowska-Bartosz et al. 2013; Yousefi et al. 2014). Researchers have suggested that the lipid peroxidation products were increased in MS patients and could possibly be valid predictors of

disease progression, and these products could result from ROS overproduction and the generation of metabolites due to alterations in energy metabolism (Tavazzi et al. 2011). Furthermore, Gonzalo et al. (2012) reported that MS associated lipid peroxidation would include increased protein modification that would serve as driving force for enhanced autoimmune response and progression of the disease, thereby lipid peroxidation could be a significant pathogenical factor in MS. In addition, protein carbonyl formation seems to be a common phenomenon during oxidation and its quantification can be used as biomarker protein damage (Dalle-Donne et al. 2003). Reinforcing this line of reasoning, Rommer et al. (2014) have described that carbonyl proteins also may serve as marker for oxidative stress in the cerebrospinal fluid (CFS) of relapsing and progressive MS patients. Considering these statements, we may infer that the lipid and protein damage observed in our study may contribute to neurological dysfunction in RRMS patients.

In this study, we also showed DNA damage in the leucocytes of MS patients compared with the control group (Fig. 4). It is important to observe that lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage generally lead to cell dysfunction and death by apoptosis or necrosis due to overproduced superoxide radicals (McCord, 2005). This increase in DNA damage may suggest that patients with RRMS have a higher number of apoptotic cells, and therefore, an apoptosis mechanism may be responsible for the effect on the lymphocyte function in MS (Grecchi et al. 2012).

In addition, hydrogen peroxide (H_2O_2), one of the main ROS, is a typical inducing agent in oxidative DNA damage (Benhusein et al. 2010). In line with this, in our study, we observed that SOD activity is decreased in whole blood from RRMS patients compared with the control group (Fig. 5a). SOD is the first line of cellular defense against oxidative injury, which involves the removal of superoxide anions and H_2O_2 and has a crucial anti-oxidant role in human health (Johnson and Giulivi 2005). A possible explanation for this reduction in SOD activity may be the excess of free radicals that may result in the inactivation of this enzyme (Schmatz et al. 2012). Furthermore, the decrease in the activity of this antioxidant enzyme might be responsible for the oxidative alterations observed in our study in RRMS patients (Miller et al. 2013). Corroborating these results, other studies have reported that activity of SOD is reduced in erythrocytes from MS patients (Kopff et al. 1993; Miller et al. 2010).

Another important enzymatic antioxidant defense is CAT, which acts in the detoxification of H_2O_2 and plays an important role in the adaptive response of cells in pathological conditions (Matés and Sánchez-Jiménez 1999). It operates when the clearance of high concentrations of H_2O_2 is required (Mirshafiey and Mohsenzadegan 2009). In the present study, the activity of CAT was significantly increased in whole blood from RRMS patients compared with healthy subjects (Fig. 5b). This finding may reflect an effort to partially compensate for the increased oxidative stress or may be the result of an increase in the concentration of H_2O_2 in the circulation. In addition, an increase in CAT activity and TBARS levels may be explained by the hypothesis proposed by Ljubisavljevic et al. (2013), which supposed that H_2O_2 can diffuse from the sites of generation in the perivascular space and induce the peroxidation of lipids in all CNS cells, axonal membranes and myelin, inducing CAT activity due to its dependence on the H_2O_2 concentration.

The antioxidants, synthesized endogenously or exogenously administered, are reducing agents that neutralize ROS before they damage different biomolecules (Miller et al. 2013). Thus, we can speculate that the increased levels of oxidative stress biomarkers and decreased levels of important antioxidant enzymes found in this study may indicate a probable increase in ROS levels resulting in the depletion of cellular antioxidants.

To reinforce the previously mentioned findings, in the next set of experiments, we verified the non-enzymatic antioxidants levels, such as vitamin C, vitamin E and NPSH. The levels of all of these non-enzymatic antioxidants defenses were significantly decreased in serum of RRMS patients compared with the control group (Figs. 6a, b and c). Studies have demonstrated that the reduction of antioxidants is an important contributor to the progression of degenerative neurological diseases due to oxidative damage to cell components (Mazza et al. 2007). In this sense, it has been shown that the treatment with antioxidants combined with the conventional therapies used for treatment of MS might be beneficial (Gilgun-Sherki et al. 2004; Løken-Amsrud et al. 2013).

Evidence suggests that vitamin E, which is found in high concentrations in the membranes of immune cells, can promote beneficial effects in neurodegenerative diseases through its antioxidant properties and mainly by reducing the degree of oxidative stress (Li-Weber et al. 2002; Ricciarelli et al. 2007). A possible mechanism for this condition could be higher a consumption of this vitamin to counterbalance MS

chronic neurodegeneration (Salemi et al. 2010), thereby helping to decrease inflammation and immune-mediated tissue damage (Mora et al. 2008).

With this line of reasoning, the regeneration of vitamin E (α-tocopherol) is performed by vitamin C (Villacorta et al. 2007). Thus, the low levels of vitamin C in patients with RRMS observed in our study suggest that protection against lipid peroxidation will not occur due to reduction in the normal concentrations of these vitamins, which are essential to prevent lipid peroxidation (Padh 2005). Furthermore, vitamin C has a protective role against the oxidation of -SH groups, which may not occur due to the reduction in its levels (Paniz et al. 2007). Additionally, it is important to note that the significant decrease in NPSH and vitamin C levels, together with the increase in TBARS levels found in this study, can create a strategic position against ROS-mediated brain damage (Mitosek-Szewczyk et al. 2010). Our results are in accordance with others studies that show cellular oxidative damage together with reduced antioxidant capability in patients with MS compared to healthy controls (Salemi et al. 2010; Pasquali et al. 2015).

From these findings, we can postulate that this significant reduction in non-enzymatic antioxidant defenses found in MS patients is due to the scarcity of these non-enzymatic antioxidants or by depletion of the antioxidants, which when consumed may make up for the increase in oxidative stress. Oxidative stress leads to systematic, peripheral, and CNS changes, which probably induce each other (Haider et al. 2011).

Another important aspect to be discussed is that the vitamin D levels were also decreased in the serum of MS patients compared with health individuals (Fig. 7). These results are in agreement with studies that reported that the serum levels of 25(OH)D, a modulator of immune function, are lower in MS patients in comparison with healthy controls (Ozgocmen et al. 2005). One possible mechanism for this reduction is a decrease in synthesis or an increase in 25(OH)Vitamin D degradation, which was observed in MS patients (Correale et al. 2009). The low concentration of vitamin D could contribute to the pro-inflammatory response in RRMS patients because this vitamin induces IL-10 synthesis, which is considered to be the main anti-inflammatory cytokine (Allen et al. 2012). In line with this, in previous studies, we found a significant decrease in IL-10 in RRMS patients (Polachini et al. 2014).

Preliminary evidence suggested that a poor vitamin D status is associated with an unfavorable course of MS and appears to influence the incidence of subsequent

relapse and/or disability in MS patients (Smolders et al. 2008; Simpson et al. 2010). In addition, the high circulating levels of 25(OH)D have been related to a lower risk of MS (Munger et al. 2004). According to Gianforcaro and Hamadeh (2014), it has been demonstrated that vitamin D can reduce the expression of the biomarkers of oxidative stress and inflammation in MS patients. In line with this, researchers have suggested that the expression of the MHC class II allele HLA-DRB1*15, which is a major MS genetic risk factor, is directly stimulates by vitamin D (Ramagopalan et al. 2009).

It is also important to emphasize that oxidative stress, DNA defects and insufficient vitamin D levels may contribute to the development and progression of MS (Mao and Reddy 2010). Based on the findings of this study, we suggest that RRMS patients have significant increases in cell damage associated with a reduction in non-enzymatic and enzymatic antioxidant defenses, which may contribute to enhance of pro-inflammatory processes and the consequent oxidative stress. On the other hand, it is important to note that the increase in ALA activity can represent an important cell defense mechanism.

In conclusion, for the first time, we reported that δ-ALA-D activity is altered in RRMS. We also showed a relationship between the biomarkers of oxidative stress and vitamin D levels in RRMS patients. Taken together, these results may contribute to a better understanding of the complex pathogenic mechanisms involved in this disease and thus potential novel strategies for the treatment of patients with MS.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the neurologist Juarez Lopes and the MS patients and healthy subjects that contributed to the realization of this study. We also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), FAPERGS/PPSUS 1279-2551/13-7, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net), INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection, and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil for financial support.

DISCLOSURES

This work is original and is not under consideration by another journal. All of the patients provided written consent, and the work was approved by the Human Ethical Committee from the Federal University of Santa Maria Hospital. Finally, this manuscript has been approved by all of the authors, and none of the authors have a conflict of interest.

References

Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol 105:121-126

Allen AC, Kelly S, Basdeo SA, Kinsella K, Mulready KJ, Mills KH, Tubridy N, Walsh C, Brady JJ, Hutchinson M, Fletcher JM (2012) A pilot study of the immunological effects of high-dose vitamin D in healthy volunteers Mult Scler 18: 1797-1800

Ascherio A, Munger KL, Lünemann JD (2012) The initiation and prevention of multiple sclerosis. Nat Rev Neurol 8:602-612

Benhusein GM, Mutch E, Aburawi S, Williams FM (2010) Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. Libyan J Med 5:1-6

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

Correale J, Ysrraelit MC, Gaitán MI (2009) Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. Brain 132:1146-1160

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human diseases. Trends Mol Med 9:169-176

Djordjević VB, Zvezdanović L, Cosić V (2008) Oxidative stress in human diseases. Srp Arh Celok Lek 136 :158-165

Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 82:70-77

Fialkow L, Wang Y, Downey GP (2007) Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. Free Radic Biol Med 42:153-164

Friese MA, Schattling B, Fugger L (2014) Mechanisms of neurodegeneration and axonal in multiple sclerosis. Nat Rev Neurol 10:225-238

Gianforcaro A, Hamadeh MJ (2014) Vitamin D as a potential therapy in amyotrophic lateral sclerosis. CNS Neurosci Ther 20:101-111

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D (2004) The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. J Neurol 251:261-268

Gonsette RE (2008) Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. J Neurol Sci 274:48-53

Grecchi S, Mazzini G, Lisa A, Armentero MT, Bergamaschi R, Romani A, Blandini F, Di Perri C, Scovassi AI (2012) Search for cellular stress biomarkers in lymphocytes from patients with multiple sclerosis: a pilot study. PLoS One 7:e44935

Gröber U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF (2013) Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. Dermatoendocrinol 5:331-347

Gonzalo H, Brieva L, Tatzber F, Jové M, Cacabelos D, Cassanyé A, Lanau-Angulo L, Boada J, Serrano JC, González C, Hernández L, Peralta S,Pamplona R, Portero-Otin M (2012). Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenicmechanism. J Neurochem 123:622-34

Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Ho¨ftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H (2011) Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. Brain 134:1914-1924

Halliwell B (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutr Rev 70:257-265

Han X, Zhou DB, Xu CM, Yang Y, Duan MH, Wang X, Zhang JP, Zhao YQ, Shen T, Wu YJ (2011) Effect of erythropoietin on proinflammatory factors of human monocytes and its mechanisms. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 19(3):738-743

Hansen LG, Warwick WJ (1969) A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. Tech Bull Regist Med Technol 39:70-73

Hanwell HEC, Banwell B (2011) Assessment of evidence for a protective role of vitamin D in multiple sclerosis. Biochim Biophys Acta 1812: 202-212

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. Mutagenesis 18:45-51

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM (2011) Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 96:1911-1930

Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB (2001) Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. Pharmacol Toxicol 88:119-125

Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. Free Radic Biol Med 20:251-256

Johansson SV, Strandberg PO (1972) Haem biosynthesis studied in patients with rheumatoid arthritis. J Clin Pathol 25:159-162

Johnson F, Giulivi C (2005) Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol Aspects Med 26:340-352

Kang Z, Zhang J, Zhou J, Qi Q, Du G, Chen J(2012) Recent advances in microbial production of δ-aminolevulinic acid and vitamin B12. Biotechnol Adv 30:1533-1542

Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema DJ, De Keyser J (2006) Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. J Neurol 253:483-487

Kopff M, Zakrzewska I, Czernicki J, Klem J, Strzelczyk M (1993) Red cell superoxide dismutase and catalase activity in multiple sclerosis. Acta Biochim Pol 40:154-157

Lassmann H, van Horssen J (2011) The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. FEBS Lett 585:3715-3723

Lee DH, Gold R, Linker RA (2012) Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters. Int J Mol Sci 13:11783-11803

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol 186:464-478

Li-Weber M, Weigand MA, Giaisi M, Süss D, Treiber MK, Baumann S, Ritsou E, Breitkreutz R, Krammer PH (2002) Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death. J Clin Invest 110:681-690

Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Kocic G, Savic D, Cvetkovic T, Pavlovic D (2013a) Cerebrospinal Fluid and Plasma Oxidative Stress Biomarkers in Different Clinical Phenotypes of Neuroinflammatory Acute Attacks. Conceptual Accession: From Fundamental to Clinic. Cell Mol Neurobiol 33:767-777

Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Cvetkovic T, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic D, Stefanovic N, Pavlovic D (2014) Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. J Neurol Sci 337:8-13

Løken-Amsrud KI, Myhr KM, Bakke SJ, Beiske AG, Bjerve KS, Bjørnarå BT, Hovdal H, Lilleås F, Midgard R, Pedersen T, Benth JŠ, Torkildsen Ø, Wergeland S,Holmøy T

(2013) Alpha-tocopherol and MRI outcomes in multiple sclerosis--association and prediction. PLoS One 8:e54417

Mao P, Reddy PH (2010) Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? Biochim Biophys Acta 1802:66-79

Matés JM, Sánchez-Jiménez F (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Front Biosci 4:D339-45

Mazza M, Pomponi M, Janiri L, Bria P, Mazza S (2007) Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 31:12-26

McCaddon A (2013) Vitamin B12 in neurology and ageing; clinical and genetic aspects. Biochimie. 95:1066-1076

McCord JM, Edeas MA (2005) SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. Biomed Pharmacother 59:139-142

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W,Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol 50:121-127

McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutat Res 288:47-63

Miller E, Mrowicka M, Malinowska K, Zołyński K, Kedziora J (2010) Effects of the whole-body cryotherapy on a total antioxidative status and activities of some antioxidative enzymes in blood of patients with multiple sclerosis-preliminary study. J Med Invest 57:168-173

Miller E, Walczak A, Majsterek I, Kędziora J (2013) Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. J Neuroimmunol 257:97-101

Mirshafiey A, Mohsenzadegan M (2009) Antioxidant therapy in multiple sclerosis. Immunopharmacol Immunotoxicol 31:13-29

Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. Journal Biol Chem 247:3170-3175

Mitosek-Szewczyk K, Gordon-Krajcer W, Walendzik P, Stelmasiak Z (2010) Free radical peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid therapy. Folia Neuropathol 48:116-122

Mora JR, Iwata M, von Andrian UH (2008) Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. Nat Rev Immunol 8:685-698

Morelli A, Ravera S, Calzia D, Panfoli I (2012) Impairment of heme synthesis in myelin as potential trigger of multiple sclerosis. Med Hypotheses 78:707-710

Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A (2004) Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. Neurology 62:60-65

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. J Histochem Cytochem 49:1183-1186

Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Bitzer-Quintero OK, Ramírez-Anguiano AC, Flores-Alvarado LJ, Ramírez-Ramírez V, Macias-Islas MA, Torres-Sánchez ED (2013) Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. Clin Dev Immunol 2013:708659

Ozgocmen S, Bulut S, Ilhan N, Gulkesen A, Ardicoglu O, Ozkan Y (2005) Vitamin D deficiency and reduced bone mineral density in multiple sclerosis: effect of ambulatory status andfunctional capacity. J Bone Miner Metab. 23:309-313

Padh H (2005) Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. Cell Mol Biol Lett 10:255-264

Paniz C, Bairros A, Valentini J, Charão M, Bulcão R, Moro A, Grune T, Garcia SC (2007) The influence of the serum vitamin C levels on oxidative stress biomarkers in elderly women. Clin Biochem 40:1367-1372

Pasquali L, Pecori C, Lucchesi C, LoGerfo A, Iudice A, Siciliano G, Bonuccelli U (2015) Plasmatic oxidative stress biomarkers in multiple sclerosis: relation with clinical and demographic characteristics. Clin Biochem 48:19-23

Pekmezci D (2011) Vitamin E and Immunity. Vitam Horm 86:179-215

Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC (2013) Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis. Ther Adv Neurol Disord 6:81-116

Polachini CR, Spanevello RM, Casali EA, Zanini D, Pereira LB, Martins CC, Baldissareli J, Cardoso AM, Duarte MF, da Costa P, Prado AL, Schetinger MR, Morsch VM (2014) Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. Neuroscience 266:266-274

Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dyment DA, Deluca GC, Herrera BM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Knight JC (2009) Expression of the multiple sclerosis associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated byvitamin D. PLoS Genet 5:e1000369

Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF (2015) Multiple sclerosis-a quiet revolution. Nat Rev Neurol 11:134-142

Reinhardt K, Weiss S, Rosenbauer J, Gartnera J, von Kries R (2014) Multiple sclerosis in children and adolescents: incidence and clinical picture–new insights from the nationwide German surveillance (2009–2011) Eur J Neurol 21: 654-659

Reynolds R, Roncaroli F, Nicholas R, Radotra B, Gveric D, Howell O (2011) The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. Acta Neuropathol 122:155-170

Ricciarelli R, Argellati F, Pronzato MA, Domenicotti C (2007) Vitamin E and neurodegenerative diseases. Mol Aspects Med 28:591-606

Rocha JBT, Saraiva RA, Garcia SC, Gravina FS, Nogueira CW (2012) Aminolevulinate dehydratase (δ-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. Toxicol Res 1:85-102

Rocha ME, Dutra F, Bandy B, Baldini RL, Gomes SL, Faljoni-Alario A, Liria CW, Miranda MT, Bechara EJ (2003) Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. Arch Biochem Biophys 409:349-365

Rommer PS, Greilberger J, Salhofer-Polanyi S, Auff E, Leutmezer F, Herwig R (2014) Elevated levels of carbonyl proteins in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerativediseases. Tohoku J Exp Med 234:313-317

Sadowska-Bartosz I, Adamczyk-Sowa M, Galiniak S, Mucha S, Pierzchala K, Bartosz G (2013) Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. Neurochem Int 63:507-516

Salemi G, Gueli MC, Vitale F, Battaglieri F, Guglielmini E, Ragonese P, Trentacosti A, Massenti MF, Savettieri G, Bono A (2010) Blood lipids, homocysteine, stress factors, and vitamins in clinically stable multiple sclerosis patients. Lipids Health Dis 9:19

Sassa S (1982) Delta- aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme 28 133-145

Sassa S (1998) ALAD porphyria. Semin Liver Dis 18:95-101

Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierres J, Bagatini M, Martins CC, Abdalla FH, Daci da Silva Serres J, Zanini D, Vieira JM, Cardoso AM, Schetinger MR, Morsch VM (2012) Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Biochimie 94:374-383

Simpson S Jr, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, Dwyer T, Gies P, van der Mei I (2010) Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. Ann Neurol 68:193-203

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184-191

Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R (2008) Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. Mult Scler 14: 1220-1224

Souza JB, Rocha JB, Nogueira CW, Borges VC, Kaizer RR, Morsch VM, Dressler VL, Martins AF, Flores EM, Schetinger MR (2007) Delta-aminolevulinate dehydratase (δ-ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. Clin Biochem 40:321-325

Tavazzi B, Batocchi AP, Amorini AM, Nociti V, D'Urso S, Longo S, Gullotta S, Picardi M, Lazzarino G (2011) Serum metabolic profile in multiple sclerosis patients. Mult Scler Int 2011:167156

Trapp BD, Nave KA (2008) Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? Annu Rev Neurosci 31:247-269

Valentini J, Grotto D, Paniz C, Roehrs M, Burg G, Garcia SC (2008). The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. Biomed Pharmacother 62:378-382

van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, van der Valk P, de Vries HE (2008) Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. Free Radic Biol Med 45:1729-1737

van Horssen J, Witte ME, Schreibelt G, Helga E, de Vries HE (2011) Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. Biochim Biophys Acta 1812:141-150

Van Laer K, Hamilton CJ, Messens J (2013) Low-molecular-weight thiols in thiol-disulfide exchange. Antioxid Redox Signal 18:1642-1653

Villacorta L, Azzi A, Zingg JM (2007) Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. Mol Aspects Med 8:507-537

Wacker M, Holick MF (2013) Vitamin D effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. Nutrients 5:111-148

Yousefi B, Ahmadi Y, Ghorbanihaghjo A, Faghfoori Z, irannejad VS (2014) Serum arsenic and lipid peroxidation levels in patients with multiple sclerosis. Biol Trace Elem Res 158:276-279

Zanini D, Pelinson LP, Schmatz R, Belmonte PL, Curry MC, Baldissareli J, Pires AG, Antunes S FA, Brenner RLG, Araújo MC, Chiesa J, Morsch VM, Bitencourt RLD, Schetinger MR (2014) δ-aminolevulinate dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress. Biomed Pharmacother 68:603-609

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 δ-ALA-D activity in the whole blood of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. ***Indicates a significant difference from the control group (Student´s *t*-test, ****P*<0.0001, n = 29).

Fig. 2 Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the serum of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. ***Indicates a significant difference from the control group (Student´s t-test, ****P*<0.0001, n = 29).

Fig. 3 Protein carbonyl content in the serum of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. *Represents a significant difference from the control group (Student´s t-test, **P*<0.05, n = 20).

Fig. 4 The comet assay on the leukocytes of healthy subjects and MS patients. **a** Comet image of blood cells showing a nucleus without damage and nuclei with different damage levels. **b** DNA damage comparison between healthy subjects and MS patients. DNA index damage calculation Σ (1,2,3,4 comet class)/100. **Represents a significant difference from the control group (Student´s t-test, ***P*<0.001, n = 22).

Fig. 5 Enzymatic antioxidant: superoxide dismutase (a) and catalase (b) activities in the whole blood of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. **Represents a significant difference from the control group (Student´s *t*-test, ***P*<0.001, n = 29).

Fig. 6 Non-enzymatic antioxidant: vitamin C (a), vitamin E (b) and non-protein thiol (NPSH) (c) levels in the serum of healthy subjects and MS patients. The results are

expressed as the mean ± SEM. ***Represents a significant difference from the control group (Student´s *t*-test, ****P*<0.0001, n = 29 and **P<0.001, n=20, respectively).

Fig. 7 Vitamin D quantification in the serum of healthy subjects and MS patients. The results are expressed as the mean ± SEM. *Represents significant difference from the control group (Student´s *t*-test, **P*<0.05, n = 29).

Figures

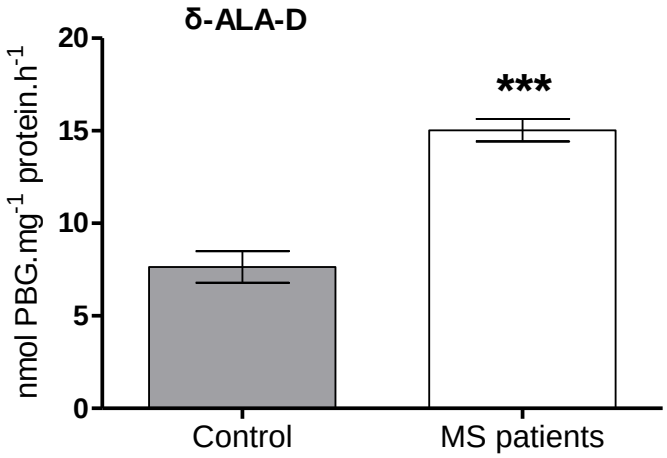


Fig. 1

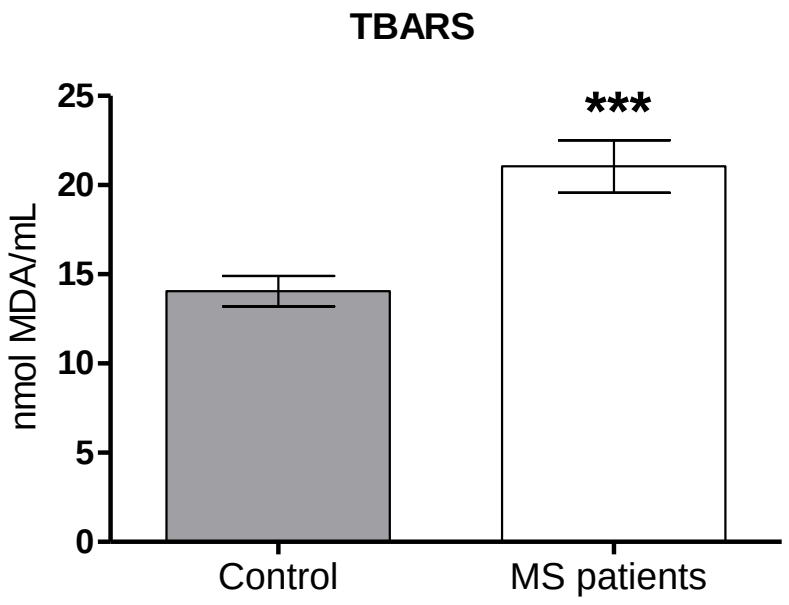

TBARS
nmol MDA/mL
25
20
15
10
5
0
***
Control
MS patients

Fig. 2

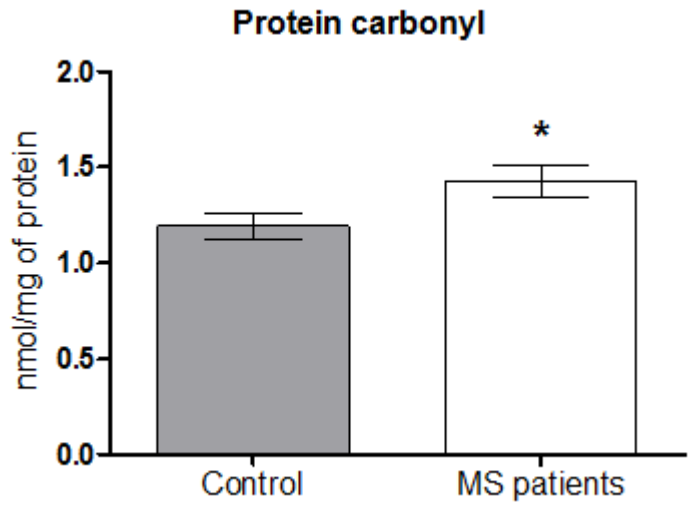
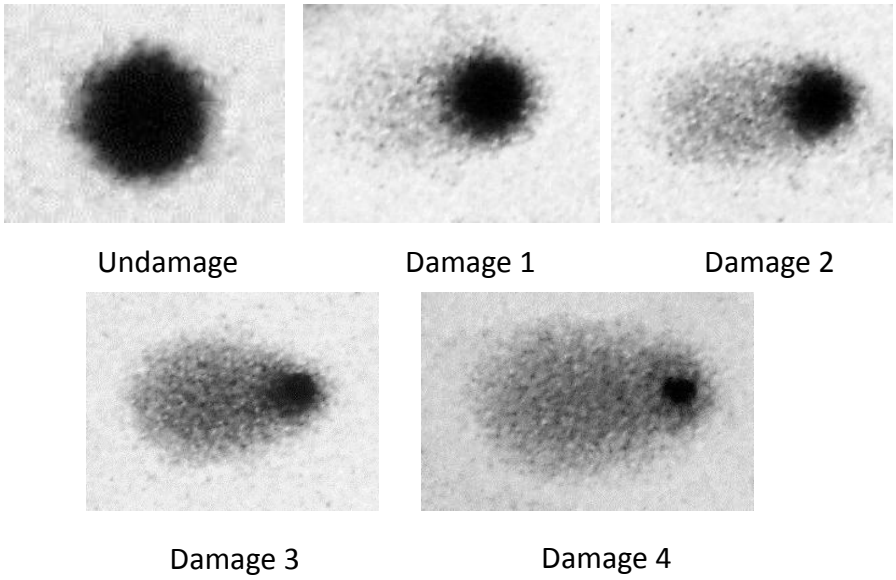

Protein carbonyl
nmol/mg of protein
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Control
MS patients

Fig. 3

a


Undamage
Damage 1
Damage 2
Damage 3
Damage 4

b

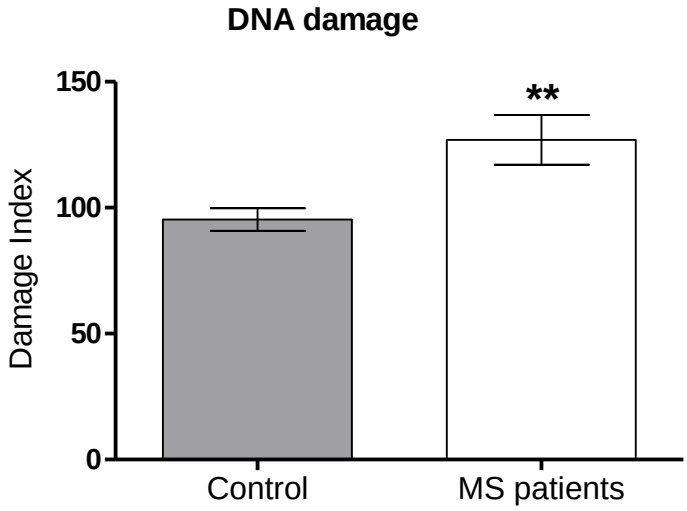
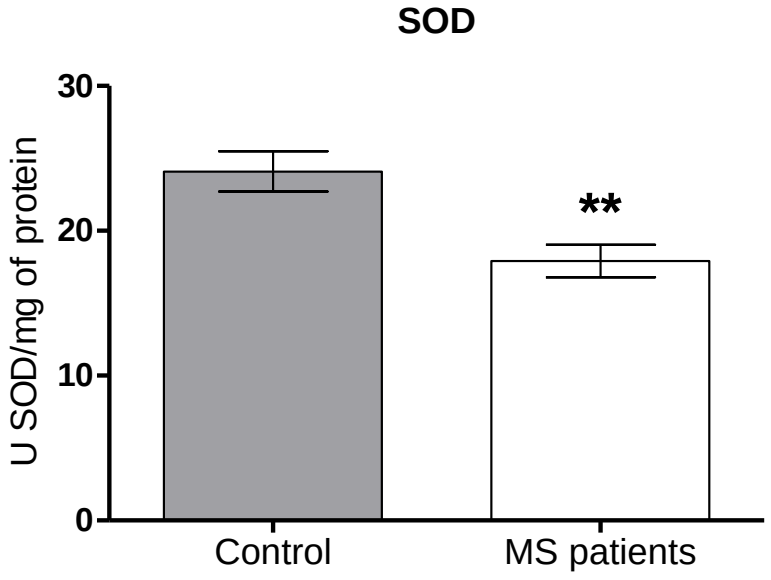

DNA damage
Damage Index
150
100
50
0
**
Control
MS patients

Fig. 4

a


SOD
U SOD/mg of protein
30
20
10
0
**
Control
MS patients

b

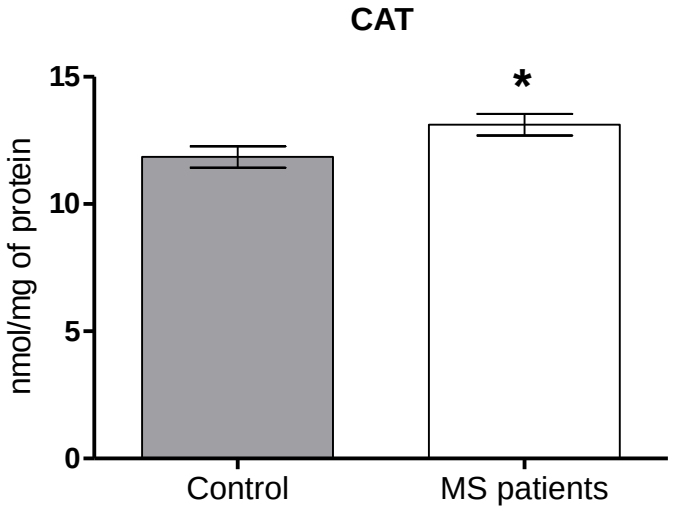
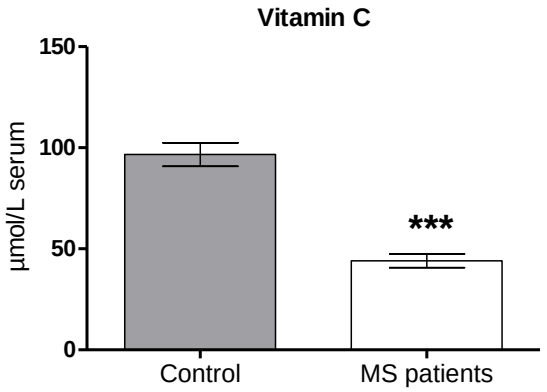
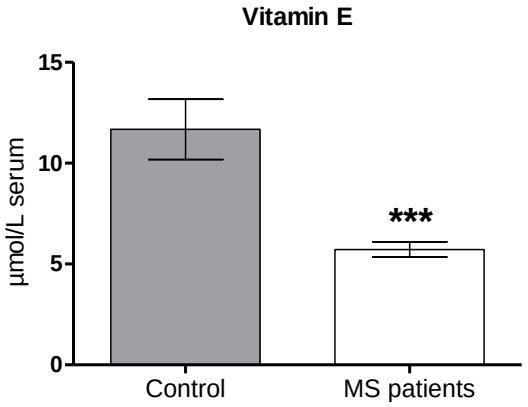

CAT
nmol/mg of protein
15
10
5
0
*
Control
MS patients

Fig. 5

a


Vitamin C
150
100
50
0
µmol/L serum
***
Control
MS patients

b


Vitamin E
15
10
5
0
µmol/L serum
***
Control
MS patients

c

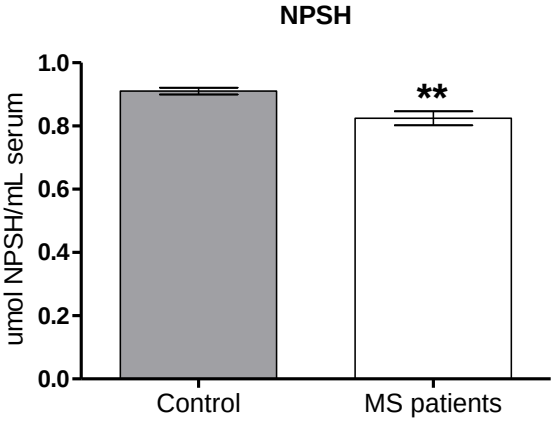

NPSH
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
umol NPSH/mL serum
**
Control
MS patients

Fig. 6

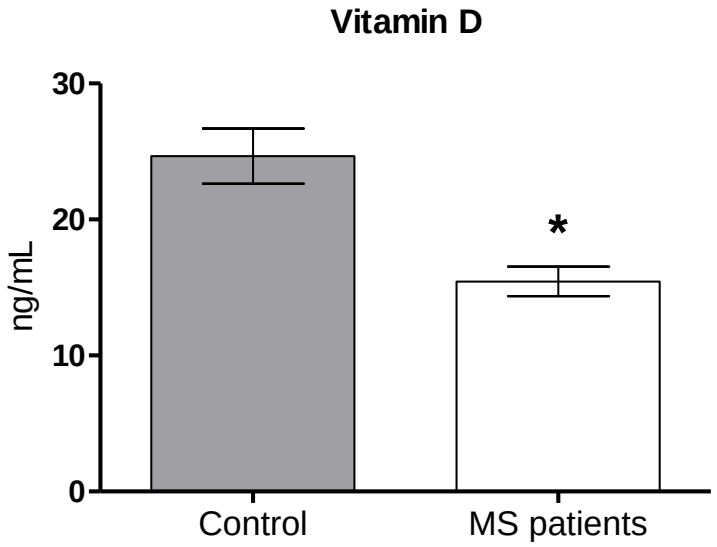


Fig. 7

Tables

Table 1 General characteristics of subjects

	Patients MS		Healthy group	
	Women	Men	Women	Men
Number of subjects	19	10	20	9
Mean age	41.0±2.6 years	39.0± 4.1 years	39.1± 2.9 years	37.3±3.2 years
Disease duration	10.6± 2.4 years	7.8± 2.3 years	-	-
Family history	0%	0%	-	-
Smoker	0%	0%	0%	0%
Race				
Caucasians	100%	100%	100%	100%
Medication				
Glatiramer acetate	11	5	-	-
Interferon β	3	5	-	-
No medication	5	-	-	-

Continuous variables are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) and the other variables are shown as percentage of patients.

Table 2 Blood parameter of MS patients and healthy subjects

Parameters	MS patients	Control
Erythrocytes (million/mm^3)	4.24 ± 0.15	4.44 ± 0.16
Hemoglobin (g/dL)	13.02 ± 0.32	13.56 ± 0.53
Hematocrit (%)	38.86 ± 0.94	40.56 ± 1.26
VCM (fL)	91.82 ± 1.72	91.06 ± 0.92
HCM	30.77 ± 0.56	30.41 ± 0.50
CHCM (g/dL)	33.50 ± 0.08	33.22 ± 0.39
RDW (%)	12.70 ± 0.46	13.18 ± 0.11

Data are represented as the mean ± SEM

VCM mean corpuscular volume, *HCM* mean corpuscular hemoglobin, *CHCM* mean corpuscular hemoglobin concentration, *RDW* red cell distribution width

Table 3 Activity of δ-ALA-D and its correlation with oxidative stress parameters in RRMS patients.

Correlation	Pearson r	P value (two-tailed)
TBARS	-0.420	0.0036*
Carbonyl protein	-0.381	0.1070
SOD	0.535	0.0396*
CAT	0.560	0.0298*

TBARS thiobarbituric acid reactive substances, *SOD* superoxide dismutase, *CAT* catalase

* P<0.05 (Pearson's correlation)

5.2 MANUSCRITO

Review article

Cholinergic and Purinergic systems: A key to multiple sclerosis?

Carla Roberta Nunes Polachini, Roselia Maria Spanevello, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch

Submetido ao periódico: ***Journal of the Neurological Sciences***

Review article

Cholinergic and Purinergic systems: A key to multiple sclerosis?

Carla Roberta Nunes Polachini[a*], Roselia Maria Spanevello[b], Maria Rosa Chitolina Schetinger[a], Vera Maria Morsch[a*]

[a] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

[b] Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

[*]Corresponding authors
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil
Tel/Fax:+55-55-3220-9557
E-mail addresses: polachini.carla@gmail.com; carlinha_polachini@hotmail.com (Carla Roberta N. Polachini), veramorsch@gmail.com (Vera Maria M. Morsch)

Abstract

Multiple sclerosis (MS) commonly affects young adults and leads to a decreased quality of life due to different signs and symptoms that induce physical, cognitive, social, and psychological challenges. This disease, an autoimmune neurological disorder, is characterized by chronic inflammatory demyelination and axonal degeneration of the central nervous system (CNS). To date, its etiology is unknown. A large number of physiological functions are regulated by the cholinergic system because acetylcholine (ACh) acts in cholinergic neurons and various nonneuronal cells, such as those of the immune system and blood; thus, it is considered an important modulatory pathway of both the central and peripheral nervous systems. Furthermore, the purinergic system has a significant role in neurotransmission as well as immune and inflammatory responses. Accumulating evidence has suggested the presence of a strong correlation between these systems and MS. Therefore, this review aims to present and discuss the main mechanisms that potentially explain the influence of the cholinergic and purinergic systems in multiple sclerosis. These mechanisms are discussed in light of available scientific evidence in humans and animal experimental models of MS. We hope that this review provides a better understanding of this subject, helping to guide future research and potential novel therapeutic strategies for patients with MS.

Keywords: Multiple sclerosis, Cholinergic system, Purinergic system, Human, Animal models.

Contents

1. Introduction..... 4
2. Therapeutic implications in MS..... 6
3. Experimental models of MS: a way to study this disease..... 8
4. Studies in humans with MS..... 10
5. The cholinergic system and MS..... 12
5.1 Patients with MS and the cholinergic system: facts, experiences and expectations..... 14
5.2 Relationship: research in MS animal models and cholinergic system..... 16
6. Purinergic system and MS..... 17
6.1 Patients with MS and purinergic system - facts, experiences and expectation..... 19
6.2 Relationship: research in MS animal models and the purinergic system…… 22
7. Conclusions..... 23
Conflict of interest..... 25
Acknowledgments..... 26
References..... 27

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, autoimmune, inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination and sequential axonal loss resulting in neurodegeneration [1]. This process occurs in both white matter and gray matter [2], accompanied by chronic neuroinflammation, which interferes in the immune mechanisms responsible for regulating and limiting the inflammatory cascade. Thus, in this disease the immune cells break down the blood-brain-barrier vascular endothelium and exert harmful effects on myelin and oligodendrocytes [3,4]. Furthermore, the glial cells respond to pathological stimuli through antigen presentation and cytokine and chemokine signaling to create a proinflammatory environment [5,6].

This illness affects approximately 2.5 million people worldwide [7,8], usually with an age of onset between 20 and 50, although it may develop in childhood and older adulthood [9,10]. Its incidence is higher in women than in men [11], presumably due to hormonal differences because sex hormones such as progesterone and estrogen influence type 1 helper T cells (Th1) or Th2 differentiation; moreover, autoimmune diseases typically are more prevalent in females [12]. It can affect motor, sensory, cognitive, cerebellar, sphincter, and spinal cord areas [13] generating symptoms such as chronic muscular fatigue, visual problems, paresthesia, spasticity, and depression, which arise from demyelination in association with axonal damage and a consequent slowing of nerve signals [14]. The most common initial symptoms are those related to cranial nerves, followed by sensory and motor symptoms [15].

MS is a complex disease with a poorly understood etiology. Studies verified that the genetic variations associated with MS influence its clinical course; therefore, gene-environment interactions might be an important mechanism in this disease [16,17]. Strong evidence indicates that, in addition to genetic predisposition, lifestyle and environmental factors contributors to MS, including exposure to tobacco smoke, low levels of vitamin D, high latitude, viral infection, and obesity during adolescence [18]. In addition, recent findings indicate that increased body mass index is directly associated with the risk of development of MS, suggesting that this association may reflect the influence of inflammatory pathways that characterize both obesity and the neuropathogenesis of MS [19]. Another important aspect reported in recent works is

that these risk factors may lead to increased comorbidities such as depression, anxiety, hypertension, hyperlipidemia, and diabetes [20].

This disease is characterized by episodic, partially reversible symptomatic attacks and a demyelination process out of proportion to axonal loss [11]. According to symptomatology and clinical findings, four different subtypes characterize the clinical course of MS: progressive relapsing (PRMS), primary progressive (PPMS), secondary progressive (SPMS), and relapsing remitting (RRMS). The latter is the most prevalent form (80%–85% of cases) [21]. RRMS is described with recurrent and unpredictable episodes of neurological deficits, such as loss of vision and paralysis, followed by a recovery period [5]. The failure of the recovery processes due to repeated inflammatory attacks leading to irreversible axonal damage originates as absence of remission in late-stage RRMS, resulting in some disability in MS patients; then, clinical-pathological evidence suggests that axonal loss is probably the pathological substrate of established disability in this disease [22]. In cases diagnosed with the PPMS form, the progression of disability is continuous, and there are minor temporary improvements. SPMS is characterized by lower recovery following attacks and progressively worsening disability [8]. In the course of PRMS (5% of cases), the patient shows progressive disability from the onset [21].

Diagnosis is difficult due to the highly variable initial clinical manifestation and course of the disease; to date, there is no single clinical feature or biological marker to diagnose MS. The diagnosis is mainly by clinical findings based on the 2010 McDonald criteria; this is accomplished by identifying lesions on magnetic resonance imaging (MRI), the presence of oligoclonal bands, and/or high levels of immunoglobulin G (IgG) in the cerebrospinal fluid (CSF) [15,9]. Abdel-Aziz et al. [23] showed through imaging techniques related to patient disability that there is a reduction in the structural integrity of neurons and demyelination as well as abnormalities in the glutamatergic pathways in the cervical spine of patients with early PPMS; thus, early spinal neurodegeneration can be an important determinant of disability progression underlying clinical impairment in these patients.

MS has a significant socioeconomic impact for patients since it is considered one of the most common causes of neurological nontraumatic disability, and most of the time, it leads the person to discontinue working [24,25]. A retrospective study that evaluated social and economic consequences in the lives of patients and their families 8 years after MS diagnosis verified that patients with MS had higher rates of

health-related contact and medication use as well as a very low employment rate resulting in a higher socioeconomic cost [26]. These data showed a great need to further address the relevance of MS diagnosis to patients and society [26,27]. Cavenaghi et al. [15] showed that the mean time between the first symptom and the diagnosis is 2.84 years, and the majority of this population presented unifocal manifestation.

The CNS is protected by the immune system under homeostatic conditions; however, evidence indicates that in MS in patients it is characterized by an invasion of peripheral autoreactive immune cells and a concomitant activation of the innate immune system in the CNS [7,28]. The immunopathogenesis of MS has been discussed in detail in both human and animal models; among these models, one of the most often used to reproduce the clinical condition is experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In this experimental model myelin-specific T cells were found to be activated in secondary lymphoid organs and reactivated by myeloid cells with antigen-presenting cells featured at CNS interfaces. Next, they acted in concert with myeloid cells to cause inflammatory lesions in the white matter [28].

Furthermore, several studies sought appropriate therapeutic procedures and, consequently, to provide a better quality of life for MS patients as well as to reduce the clinical manifestations of the disease. These measures include pharmacological agents as well as nonpharmacological strategies that consist of lifestyle modifications, rehabilitation, and psychological and social support [29]. Recent research indicated that the inflammatory demyelinating process in the early relapsing stage of MS triggers a cascade of events that lead to neurodegeneration in the progressive stage, and this neurodegeneration is amplified by pathogenic mechanisms such as microglial activation, chronic oxidative injury, accumulation of mitochondrial damage in axons, and age-related iron accumulation in the human brain. Thus, the treatment of progressive MS should be based on a combination of anti-inflammatory, regenerative, and neuroprotective strategies [30].

2. Therapeutic implications in MS

Although there are many scientific studies about new treatments for MS, a cure remains unavailable; however, the frequency of relapses in this disease may be

reduced by the use of some drugs. Several treatments are available for people with RRMS, including immunomodulators, immunosuppressants, and biologics. In the acute relapses, high-dose corticosteroids as intravenous methylprednisolone pulse therapy are used for the treatment of MS exacerbations [31,32].

The first-line drugs for MS treatment, which are administered subcutaneously, are immunomodulators such as interferon beta (IFN-β) and glatiramer acetate (GA), both of which are associated with local injection-site reactions. These reduce the malfunctioning of lymphocytes by regulating their activation [21]. This long-term self-injection frequently results in patient dissatisfaction and adverse events; thus, the development of oral MS therapies has been a major goal of research [33,34]. Regarding the effects of IFNs-β and GA, a systematic review comprising 2904 randomized participants concluded that they are similar in clinical (e.g., people with relapse and risk of progression) and MRI (Gd-enhancing lesions) measures when used in the treatment of people with RRMS [35]. Immunomodulatory treatments not only reduce relapses of the disease but also decrease disability progression, suggesting that they have an important role in inflammation, at least in the early stages of the disease [30].

As previously described by us, immunosuppressants reduce the number of circulating lymphocytes along with the healthy immune cells of the body and thus may lead to considerable side effects [21]. In addition to those drugs mentioned above, other immunosuppressive and immunomodulatory agents, as well as monoclonal antibodies (alemtuzumab, natalizumab) and small molecules like fingolimod, are considered therapeutic options for MS.

Some studies have reported advances in RRMS treatment with the approval of novel medications such as fingolimod, teriflunomide, and dimethyl fumarate (DMF), three oral formulation disease-modifying drugs. However, the risks and benefits of the older injectable drugs for MS are better understood; therefore, it is extremely important to balance the potential risks and benefits of newer therapies against those of older ones [36,33]. A recent prospective cohort study analyzed peripheral blood from controls and patients with RRMS before and after treatment with DFM and found reduced total B-cell levels after treatment, with decreased levels of memory, immature, and naive B cells; however, it detected a significant increase in the total numbers of circulating B lymphocytes with regulatory capacity [37].

Additionally, previous work described by Schlöder et al. [38] suggested that DMF therapy could be efficient for these patients because this drug influences the sensitivity of T cells in the peripheral blood of patients towards Treg-mediated suppression, presumably by decreasing interleukin-6 (IL-6) production and/or by downregulation of interleukin-6R (IL-6R) expression on T cells. Thus, these authors believe that a combined treatment approach addressing T-cell responsiveness and Treg dysfunction might be beneficial. Furthermore, another important study indicated that RRMS patients who received DMF demonstrated better outcomes in terms of work productivity and health-related quality of life (HRQoL) those who received beta interferons or GA [39].

Moreover, studies have reported that the therapeutic agents mentioned above and the oral pyrimidine synthesis blocker teriflunomide seem to have similar efficacies, albeit lower than those of natalizumab, fingolimod, and dimethyl fumarate [11]. A recent review determined that the impact on sleep should also be part of the design of trials of new therapies since some drugs, including interferon-beta and some sympathomimetics, may affect sleep, thus contributing to fatigue, depression, and poor quality of life. On the other hand, they suggested that natalizumab and cannabinoids might improve sleep [34].

Another medication used in the treatment of patients with MS is fampridine, considered one of the first medical treatments for improving walking ability; however, it should be stopped if no improvement is shown after 2 weeks. Evidence indicates that physical therapy used in combination with fampridine treatment reduces healthcare utilization in the treatment of MS patients [40]. Corroborating these findings, Rodriguez-Leal et al. [41] showed that the use of fampridine for 2 weeks as recommended by the European Medicines Agency (EMA) improved gait parameters in MS patients.

Feinstein et al. [42] asserted that little is known about drug treatment for the progressive stage of MS. Many treatments and strategies are available for disease symptoms and, if possible, functional improvement; however, until now, there are no treatments that could halt further deterioration in a disease that has already entered a progressive stage. Furthermore, the approved treatments for MS are focused on suppressing inflammatory outbreaks, preventing new inflammatory outbreaks, and preventing migration of immune cells across the blood–brain barrier.

In addition, it would also be important to create new therapeutic strategies that aim to promote remyelination in the CNS following the onset of MS because the current treatment for inflammation does not necessarily assure remyelination in the lesions [43]. Choi et al. [44] indicated that there is reduced blood–brain barrier disruption, immune cell infiltration, and spinal white matter myelin destruction with oral administration of a zinc chelator. Thus, they suggested that the destruction of the myelin sheath and motor deficits during MS progression are probably related to zinc released into the extracellular space.

3. Experimental models of MS: a way to study this disease

The relapsing-remitting and chronic-progressive disease courses of MS that occur in humans and are characterized pathologically by CNS inflammation and demyelination can be developed in animals [45]. Thus, studies in experimental models are an important tool for understanding human pathologies such as MS because the modification of experimental conditions, such as the collection of early and immunologically active MS tissue samples, is much more restricted in human research compared with studies in animal and other models. Therefore, animal models have often been used to investigate the possible pathogenic mechanisms operating in MS, among these stands out EAE. Furthermore, there are other models, such as ethidium bromide (EB), cuprizone, and lysolecithin, which are toxin-induced models of demyelination, and there are viral induced models, such as Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection followed by chronic demyelination [1,46].

Demyelination induction by EB in the CNS affects the neuroglial cells in the early hours of intoxication and subsequently leads to the death of astrocytes; thus, this form of induction can be comparable to the cellular changes that occur in MS [47]. In rat models experimentally demyelinated with EB, after demyelination an increase in the inflammatory infiltrate as well as elevations in interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and interferon (INF-γ) levels were found, which could contribute to oligodendrocyte depletion in MS lesions and riser demyelination [48].

Although there is a wide variety of models that mimic MS, one of the models quite often used to replicate the clinical, electrophysiological, and pathological features of this disease is EAE. It promotes an acute inflammatory demyelinating disease of the CNS and can be induced by the injection of whole-brain homogenate or by purified preparations of myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), or proteolipoprotein (PLP) in adjuvants [49]. The infiltration of macrophages into the CNS and microglial activation are features of MS as well as of EAE. After, an investigation verified that in the peak of EAE, there were more dying activated macrophages and microglia in the white matter than in the gray matter of the spinal cords of rats, thus this discrepancy in cell death might contribute to CNS inflammation in different ways [50]. In addition, Lu et al. [51] suggest that mature dendritic cells (DCs) cause an imbalance between T-helper 17 cells (Th17) and regulatory T (Treg) cells by secreting TGF-β1 and IL-6 in the pathogenesis of EAE disease. Thus, targeting DCs may be an effective strategy for treating MS.

Studies report that there are two cell types, microglia and astrocytes, involved in brain dysfunction in EAE, generating the accumulation of hypertrophic reactive astrocytes identified in EAE lesions [52]. The degree of neuronal injury can be determined by dysfunctional astrocytes and is associated with MS and EAE [53]. Furthermore, leptin has been shown to be involved in the induction and progression of EAE [54]. Additionally, at the onset and peak of EAE, changes in the regulation of cholesterol metabolism may contribute to the progression of disease, whereas during the recovery period it may have beneficial effects on myelin sheath regeneration and restoration of neuronal function [55]. Thus, impairment in the regulation of cholesterol metabolism may be a significant event in MS.

Treatment with IFN-β improved the EAE symptoms induced by proinflammatory T-helper type 1 (Th1) cells; on the other hand, it exacerbated EAE disease induced by Th17 cells. Therefore, it was suggested that in humans with RRMS the high IL-17 concentration in serum could be associated with nonresponsiveness to therapy with IFN-β [56]. Madsen et al. [57] reported that prolonged electrical stimulation of a hindbrain region (the nucleus raphe magnus) from mouse EAE decreased demyelination and lowered cytokine production; thus, this can be a new non-pharmacological treatment strategy. Furthermore, Souza et al. [58] demonstrated that an important non-pharmacological intervention that could be used for the improvement of immune-mediated diseases such as MS is the practice

of regular mild/moderate physical exercise because it inhibits progression of EAE in mice, possibly through immunomodulatory and antioxidant effects.

4. Studies in humans with MS

The immunopathogenesis of MS can be associated with an imbalance between cytokines produced by the Th1 and anti-inflammatory T-helper type 2 (Th2) cells [45]. Prinz et al. [28] reported that in early lesions of MS, T cells are already detected, and they act directly against oligodendrocyte antigens, such as MBP, myelin oligodendrocyte glycoprotein, and proteolipoprotein. Bansi et al. [59] described that significant changes in the concentrations of Th1-associated cytokines, such as IFN-γ and TNF-α, are linked with the disease course and disability status in MS. Corroborating this study, Martins et al. [60] suggested that in addition to the proinflammatory cytokines IFN-γ and TNF-α, others such as IL-2 and IL-1β were also elevated in serum from patients with different forms of MS. This increase could promote or exacerbate lesions and thus contribute to disease progression.

Reinforcing this line of evidence, our group recently found an increase in biomarkers of inflammation such as IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-6, and C-reactive protein; on the other hand, a significant decrease in IL-10, considered the main anti-inflammatory cytokine, was observed in serum from RRMS patients [61]. Di Bari et al. [62] showed that in addition to TNF-α, IL-12/IL-23p40 and IL-18 levels were elevated in serum from RRMS patients, confirming the inflammatory state of individuals with this form of the disease. This study also found an increase in the mRNA levels of IL-18 in peripheral blood mononuclear cells, but the elevated expression of cytokines such as IL-12/IL-23p40 and TNF-α was not significant. In addition, Matsushita et al. [63] verified an increase IL-6 levels in CSF from RRMS patients in the relapse phase of this demyelinating disease.

Experiments performed on CSF from RRMS patients revealed higher CCL2, IL-9, and IL-15 levels in the remission phase than in the relapse phase. These findings suggest that these regulators might be involved in downregulating inflammation and sustaining remission in patients with this MS form. Likewise, this study showed that during the relapse phase, IL-9 and IL-15 levels were higher in RRMS patients receiving prednisolone treatment than in those without

immunotherapy, like the elevation of these cytokine levels in the remission phase [63]. Thus, inflammatory and restorative processes appear to occur simultaneously in MS patients, because the rise in proinflammatory and downregulatory cytokines is consistent with disease progression [60]. Microarray studies performed on peripheral blood mononuclear cells from RRMS patients have shown that a change in the magnitude of expression occurs between the clinical phases of relapse and remission, and these alterations are related to the activation of T-cell receptor signaling and upregulation of chemokines together with suppression of cell death by apoptosis. Persistently active peripheral inflammation was detected in these individuals [64].

CCL4 is a macrophage chemoattractant and activating cytokine produced by macrophages/microglia and a variety of other immune cells. CXCL10 is secreted by Th1 cells in response to IFN-γ. Matsushita et al. [63] observed a major portion of these chemokines in CSF from PPMS patients. On this basis, the authors suggest that the increase might reflect an ongoing inflammatory process induced by T cells and macrophage/microglia compartmentalized in the CNS in patients who have the primary progressive form of the disease. Reinforcing this line of reasoning, Iwanowski et al. [65] reported that CXCL10 and CXCL13 are involved in immunopathogenetic mechanisms of MS because it was found to be higher in the serum and CSF of patients with RRMS and PPMS than in healthy individuals; therefore, it plays a similar inflammatory role in the neurodegenerative process.

Additionally, Boziki et al. [66] demonstrated differences in matrix metalloproteinase (MMP) expression in serum and CSF between MS patients and healthy adults; therefore, MMPs were suggested as potential biomarkers of MS incidence and activity because they appear to contribute to MS pathogenesis. MMPs act as mediators of blood–brain barrier disruption and consequently, inflammation in the CNS. Corroborating these findings, Procaccini et al. [54] report that the following have been found in MS patients in the inflammatory phase of the disease: brain atrophy, cortical thinning, reduction in neuronal-specific markers, iron deposition, and other gray matter abnormalities. In a recent study Lecca et al. [67] showed that miR-125a-3p, responsible for regulating the expression of myelin gene levels in the CNS, was abnormally elevated in the cerebrospinal fluid of MS patients bearing active demyelinating lesions, and its overexpression delayed oligodendroglial maturation in

oligodendroglial precursor cells. These microRNAs possibly contribute to impaired repair of demyelinated lesions in these patients and thus to MS development.

Importantly, it has been proposed that metabolic manipulation could be a possible therapeutic tool in the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. The regulation of neuronal damage, toxic insults, and several other neurodegenerative processes are probably influenced by hormones such as leptin, ghrelin, insulin, and IGF-1 (insulin-like growth factor-1) [54]. In addition, recent studies reported an important relationship between platelets and the pathophysiology of MS as these blood components were recognized in both inflamed spinal cords and chronically active brain lesions from MS patients; they could therefore be involved in inflammation and neurodegeneration in this disease [68]. More recently, a study from our group showed that alterations in oxidant/antioxidant balance and lower vitamin D levels might be contributing to the pathophysiology of MS [69]. One may therefore speculate that there is a strong correlation between metabolic dysregulation and neurodegenerative disorders such as MS.

Evidence suggests that the cholinergic and purinergic systems have key roles in MS disease, as studies have demonstrated that some mediators present in these systems can modulate the actions of lymphocytes, contributing to pro- and anti-inflammatory events and immune responses. In this review, we attempt to clarify the important role of the cholinergic and purinergic systems in the pathogenesis of MS patients and its animal models as well as the mechanisms of actions of these systems in MS disease. This information may help us to develop novel therapeutic strategies that may aid in functional recovery of the patient and enhance the treatment of this neurodegenerative disorder.

5. The cholinergic system and MS

The cholinergic system is a key modulatory pathway of both the central and peripheral nervous systems because acetylcholine (ACh) synthesized and released by cholinergic neurons and non-neuronal cells regulates numerous physiological functions. Its main components include the neurotransmitter ACh, cholineacetyltransferase (ChAT), choline transporter (ChT), vesicular cholinergic transporter (vAChT), nicotinic receptors (nAChRs), muscarinic receptors (mAChRs),

and acetylcholinesterase (AChE) [70, 71]. Among the different enzymes types, AChE (EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), also known as cholinesterases (ChEs), stand out as being essential for the regulation of ACh turnover [72]. These enzymes exert homeostatic control over ACh through rapid and effective hydrolysis, mainly carried out by AChE, which is a specific cholinesterase with a high affinity for ACh [73, 74].

AChE is characterized by elevated concentrations in the brain, neuromuscular junction, red blood cells, and lymphocytes [75]. Another enzyme, BChE, is a nonspecific choline esterase capable of hydrolyzing an extensive variety of esters and is expressed in white matter, certain populations of neurons, and glia. It is found in the blood serum, pancreas, liver, and CNS [73, 76]. Furthermore, it is well established in the literature that there are two important classes of pre- and postsynaptic cholinergic receptors: metabotropic mAChRs and ionotropic nAChRs [77]. The nAChRs are widely expressed in both neuronal and non-neuronal tissues, as well as the immune system and various peripheral tissues. Their dysfunction is involved in the pathophysiology of many neurological disorders [78].

Progress in the fields of neuroscience and molecular biology has verified the importance of the cholinergic system in several higher-order functions in the brain [79]. In several autoimmune and/or inflammatory diseases, the cholinergic anti-inflammatory system, also known as the non-neural cholinergic system of immune cells, has an essential role in the maintenance of immunological homeostasis [72]. T and B cells, macrophages, and dendritic cells express most of the components necessary for a functional cholinergic system, and therefore constitute a system independent of cholinergic nerves that it is involved in the modulation ACh directly produced by immune system cells [80]. Therefore, cholinergic transmission is affected by immune cell proliferation, cytokine production, T helper differentiation, and antigen presentation [81].

ACh localized in the periphery and in the brain acts as a primary excitatory classical neurotransmitter as well as a neuromodulator, thus contributing to synaptic plasticity in many brain areas. The actions of ACh released from both populations of cholinergic cells are mediated through receptors: nAChRs and mAChRs [82]. Furthermore, ACh is also considered an immunomodulatory agent because it can modulate the actions of lymphocytes [83]. The synthetic action of ChAT produces ACh from choline and acetate as starting substrates. However, it is unclear how ACh

is stored; it is not known whether this neurotransmitter is stored in vesicles, and in T cells it is possibly synthesized only when necessary and released immediately [84].

Studies suggests that increased plasma and tissue activities of AChE and BChE could serve as a marker of low-grade systemic inflammation because these enzymes inactivate ACh, which may enhance inflammation [85]. In agreement with this hypothesis, the activity of BChE, which is produced by the liver, can be used as a marker to predict the prognosis of the some diseases that cause inflammation and neurodegeneration [76,86]. Moreover, AChE appears as a potential contributor in the pathways controlling inflammatory and immune responses in many pathological conditions [61]. One may, therefore, expect an increase in the cholinesterase concentration to result in a decrease in the levels of ACh, thus enhancing local and systemic inflammatory events.

Stimulation of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor (α7 nAChR) by nicotine or ACh initiates the cholinergic anti-inflammatory pathway. This mechanism results in neural inhibition of inflammation [87]. Fujii et al. [80] reported that a form of immune function regulation could be the manipulation of immune cell cholinergic activity using specific agonists and antagonists of this system. In addition, the α7 nAChR and resistance to inhibitors of cholinesterase 3 (RIC-3) are expressed in immune cells and have been implicated in MS, thus the mechanisms of action and regulation of these in the immune cholinergic system can pave the way for novel immunomodulatory agents, or towards extending the application of cholinergic agents [88]. In contrast, mAChR activation could increase T-cell proliferation and the production of inflammatory mediators; therefore, based on nicotinic and muscarinic receptor activation, the cholinergic system could mediate pro- or anti-inflammatory effects [81].

5.1. Patients with MS and the cholinergic system: facts, experiences, and expectations

It has been shown that proinflammatory cytokine synthesis can be regulated by the interaction of ACh with nicotinic receptors expressed by macrophages and other cytokine-producing cells [89]. In line with this, researchers have suggested that nAChR activation in RRMS patients has a relevant role in the modulation of

inflammatory responses, and their selective activation may contribute to balancing the cholinergic dysfunction that occurs in patients with this disease [90]. In addition, previous investigations reported that RRMS patients have lower ACh levels in the CSF and serum in at the same time as higher levels of IL-1β and IL-17 in both CSF and serum when compared with healthy subjects [91]. These results suggest that these interleukins and ACh could be involved in the pathogenesis of MS and that there is likely a relation between ACh and proinflammatory cytokine levels, given that they vary inversely with each other. These findings corroborate the statement by Huang et al. [92] that IL-17 plays a key pathogenic role in autoimmune diseases such as MS.

Reinforcing this line of reasoning, preliminary accounts from our group showed that AChE in lymphocytes and whole blood as well as BChE activities in serum were increased RRMS patients concomitant with a rise in proinflammatory cytokines [61]. One may therefore expect that an increase in cholinesterase activity would contribute to a decrease in ACh levels. In agreement with this hypothesis, Di Bari et al. [62] observed significantly lower serum ACh levels in RRMS patients; moreover, the activities of AChE and BChE in serum are accompanied by an increase in AChE and BuChE transcripts. Their findings reported for the first time that there is an inverse correlation between ACh levels and the activities of the hydrolytic enzymes AChE and BChE. Together, these results suggest that cholinergic dysfunction in MS patients could be directly related to a reduction of ACh levels caused by increased levels of ACh-degradative enzymes, which would in turn reduce the cholinergic input to the immune cells.

Evidence indicates that BChE activity may be involved in activated microglia, contributing to the proinflammatory state in patients with neurodegenerative disease, as an increase in the activity of this enzyme has been found in neuropathological studies on MS brain tissue [73]. In addition, Kooi et al. [93] reported that hippocampus from MS patients, evaluated post-mortem, have reduced activity and protein expression of ChAT, the ACh synthesizing enzyme, whereas no changes were found in AChE activity and expression. These findings suggest that the memory problems faced by MS patients may be related to a cholinergic imbalance in the hippocampus. Considering that high levels of cholinergic input are sent to the hippocampus, the loss of projection of these neurons with reduced cholinergic innervation to this area, associated with a reduction of ACh synthesis, is frequently

related to cognitive impairment in neurodegenerative disease [71]. The cholinergic neurotransmitter system has a significant role in memory and learning function [94]. Therefore, the diminished synthesis of ACh can contribute to memory impairment and cognitive function loss; these are common clinical manifestations in MS patients.

It was also suggested that AChE measured in CSF cannot be considered as a clinical biomarker for the assessment of functional alterations of the cholinergic system in RRMS patients and those with other inflammatory and non-inflammatory neurological disorders. They compared the activity of AChE in these pathological conditions and no found significant differences between the three groups of individuals [74].

Importantly, a recent study by Aeinehband et al. [95] demonstrated a correlation between CSF levels of C3, a protein that composes the complement system, and BChE activity, suggesting that the expression of complement C3 may be influenced by cholinergic action. The complement system, an important part of the innate immune system, is activated in conditions of neuroinflammation in addition to contributing to the shaping of the brain synaptic circuitry [95,96]. C3 levels in the CSF are elevated in patients with MS and correlate with MRI lesions, clinical disability, and levels of neurofilament light chain (NfL), a biomarker for nerve injury [95]. These data could reflect a potential link between intrathecal cholinergic activity and complement activation. Furthermore, recently, the soluble complement receptor 2 (sCR2), a receptor that can function as an inhibitor instead of an activators, was found to be increased in CSF from RRMS and SPMS patients and to regulate C3 function; therefore, this result suggests that sCR2 exerts a modulatory function in complement activation downstream of C3 [96].

5.2. Relationship: research in MS animal models and the cholinergic system

Li et al. [97] reported that inhibition of AChE activity may have a positive effect in the treatment of MS. Corroborating this hypothesis, Nizri et al. [98] suggested that ACh reduces the inflammatory process. In EAE, increasing the ACh concentration by chronic administration of selective acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) resulted in reduced lymphocyte proliferation and secretion of proinflammatory cytokines. In addition, Zabrodskii [99] showed that ACh treatment decreased the blood levels of

proinflammatory cytokines such as TNF-α, IL-1β, and IL-6 in mice. Thus, they proposed that the interaction between ACh and the α7nACh receptor on monocytes, macrophages, and neutrophils is responsible for the cholinergic anti-inflammatory mechanism.

In agreement with this hypothesis, studies showed that neuroinflammation induced by intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide (LPS) in rats is mediated by the α7 nAChR receptor producing an anti-inflammatory effect. This receptor is present in both the brain and the periphery and could be a therapeutic target for the control of neuroinflammation [100]. Following this line of reasoning, Nizri et al. [81] reported the effects of various cholinergic agents on disease severity of EAE, using both AChE inhibitors such as antisense (EN101) and rivastigmine as α7 activators and direct α7 agonists. They concluded that the activation of the α7 nAChR is necessary for the suppression of EAE clinical severity to occur. Therefore, the reduction EAE severity was dependent on the action of this receptor and is related to the cholinergic regulation.

Corroborating these findings, other recent works have reported that the administration of a natural AChE inhibitor, Huperzine A, in a rat model of cerebral hypoperfusion (hypoxia) resulted in reduced chronic inflammation accompanied by repair in memory deficits and myelin damage. These results suggest that interruption of the anti-inflammatory effects of ACh via stimulation of nAChR can contribute to persistent inflammation in demyelinating disorders like MS, since this molecule lose its protective role [101].

Preliminary accounts from our group suggest that IFN-β reduces AChE activity in different brain structures from rats experimentally demyelinated by EB [102]. In addition, in the same animal model, immunosuppressive agents such as the cyclosporine A inhibited AChE activity in the cerebral cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus, cerebellum, and pons [103]. Moreover, an elevation in the production of proinflammatory cytokines, such as IL-1β, IL-6, TNF-α and INF-γ, was found together with a reduction in the IL-10 content [48]. Similar results were also found in RRMS patients [61]. In the EB demyelinating model, it was also verified that treatment with ebselen and vitamin E modified cholinergic neurotransmission by altering AChE activity in the different brain regions and in erythrocytes [104]. Taken together, these findings suggest that in this experimental model of demyelination,

cholinergic dysfunction occurs, which could be caused by the action of EB on the activity of this enzyme, and the use of therapeutic agent may change this scenario.

All these studies provide clear evidence that a general shift in cholinergic homeostasis results in dysfunctions that can contribute to dangerous effects on neural and non-neural cells, affecting neurotransmission and resulting in functional and structural problems that are characteristics of MS (Fig. 1).

6. The purinergic system and MS

Purinergic signaling can have an important contribution to the development of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases such as MS [105]. The purinergic system involves the P1 and P2 purinoceptors, which respond to extracellular purines, participate in purine release and uptake, and trigger a cascade of enzymes near the cell surface responsible for the control the concentration of purines. Among these enzymes stand out the ectonucleotidases and adenosine deaminase (ADA), responsible for the hydrolysis of the adenine nucleotides ATP, UTP, ADP, UDP, AMP, and adenosine, which are important extracellular signaling molecules when binding specific receptors [106, 107]. Extracellular nucleotides are released by a variety of cell types, either innately or as a pathological or physiological response to injury/stress [108].

The concept of purinergic cotransmission was introduced in 1976; to date, evidence is consistent that adenosine triphosphate (ATP) is a cotransmitter in the peripheral and central nervous systems [109]. Intracellular ATP is primarily used to drive energy-requiring processes, whereas extracellular ATP is a danger signal released by dying and damaged cells. This molecule can cause oligodendrocyte excitotoxicity [2] and acts as an immunostimulatory signal that promotes inflammation. In a contrary manner, extracellular adenosine act as a proinflammatory agent, whereas its breakdown product, adenosine, exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action [110]. Thus, the balance between ATP and adenosine concentration is critical to immune homeostasis.

Extracellular ATP interacts with specific purinergic receptors or is degraded via different ecto-ATPases to adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP) and later to adenosine is released [111]. The modulation and

control of ATP and adenosine are mediated by a chain of ectonucleotidase enzymes, including members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (NTPDases1-8) and ecto-nucleotide pyrophosphatase/phospho-diesterase family (NPP1-3), which hydrolyze ATP, either to adenosine 5’-diphosphate (ADP) or directly to adenosine 5’-monophosphate (AMP) and 5’-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73), the latter of which catalyzes the final degradation of AMP to adenosine. Immediately after, adenosine deaminase (ADA) catalyzes the irreversible deamination of adenosine and 2'-deoxyadenosine to inosine and 2'-deoxyinosine. These enzymes are responsible for catalyzing the conversion of ATP to adenosine; therefore, they have a significant role in pathological and physiological conditions [112,106,113].

NTPDases are expressed in several tissues, among these enzymes stands out NTPDase1. It is considered a lymphocyte activation marker and can be expressed on natural killer cells, monocytes, dendritic cells, and subsets of activated T cells [114]. The majority of extracellular adenosine comes from 5’-nucleotidase via hydrolysis of AMP, and this molecule acts via adenosine receptors (P1) in a variety of physiological signaling processes [115,108]. Furthermore, adenosine has a significant modulatory role in neuronal activity, since it is responsible for the regulation of neuronal excitability as well as having neuroprotective functions in pathological conditions mediated by the activation of purinoceptors [116]. In general, alterations in the activities ectonucleotidase in the vascular system are relevant to clinical outcomes, since several cellular functions of the vascular system, including vascular tone, inflammatory responses of lymphocytes and macrophages, and platelet aggregation are regulated by adenine nucleotides and adenosine [113].

Cellular responses are induced by activation of P1 (adenosine-activated type 1 receptor), divided into four subtypes: adenosine A_1, A_{2a}, A_{2b}, and A_3 receptors, or P2, divided into two major families: P2X, an ionotropic receptor, and P2Y, a metabotropic receptor [108,117]. They play a pivotal role in purinergic signal transmission because they hydrolyze extracellular nucleotides and generate extracellular nucleosides and can thereby control their availability at purinergic P2 receptors; moreover, the extracellular adenosine formed acts as an agonist of purinergic P1 receptors [114]. By means of activation of cell surface purinergic P2 receptors, extracellular ATP and related nucleotides stimulate several pathophysiological responses [118]. Practically every cell type expresses P2 receptors and/or exhibits regulated release of ATP [118]. Previous work has demonstrated that the activation of P2 receptors, highly

expressed on astrocytes, microglia, and other immune cells and controlled by the ectonucleotidases, causes the secretion of proinflammatory cytokines and chemokines as well as immune cell migration and proliferation, which contribute to demyelination and axonal damage [119]. Burnstock [120] reported that both $P2X_7$ and P2Y receptors can be involved in MS because they regulate the remyelination processes in demyelinating diseases; moreover, and the $P2X_7$ receptor ($P2X_7R$) is widely expressed in the brain and is related to inflammatory and neurodegenerative pathological changes that affect the CNS such as the MS [121]. Therefore, extracellular purine/pyrimidine nucleotides and nucleosides plays a critical and complex role since they are involved in neurotransmission, inflammation, and immune responses [112,8].

Furthermore, Cunha [122] reported a key role of the A_{2A} receptor in neurodegeneration. The damage caused by degeneration, which affects brain synapses, leads to upregulation of A_{2A} jointly with a high release of ATP; consequently, the increase in A_{2A} function will trigger synaptotoxicity. Astrocytes and microglia also suffer loss of function, since an upregulation of A_{2A} causes a disruption of metabolic support as well as neuroinflammation; these problems in glial cells are result of damage progression in the brain.

6.1. Patients with MS and the purinergic system: facts, experiences, and expectations

Purinergic signaling influences the proper functioning of the nervous system and is considered important in the integration of functional activity between neurons, glial cells, and vascular cells in the CNS [117], in addition to mediation of immune and inflammatory responses [8]. Studies indicate that impaired ATP metabolism may be associated with clinical disability progression in MS, possibly due to depolarization-related neuroelectrical conduction block [123]. In line with this, researchers have suggested that, in neuronal cells, the electrical activity that occurs in them results in the release of ATP, and this will serve as a stimulus for the formation of myelin [2].

Previous investigations, including those of our research group, using analysis by high-performance liquid chromatography, have reported that nucleotide and

nucleoside levels are altered in the serum of RRMS patients, since they showed a decrease in ATP levels and an increase in the ADP, AMP, and inosine levels relative to healthy subjects [61]. Furthermore, preliminary accounts have reported that the levels of uric acid, hypoxanthine, and xanthine were increased in circulating MS patients, thus suggesting that these alterations in energy metabolism may arise from increased energy demands caused by injury in disease resulting from energy stress [124].

Recent studies evaluated the levels of adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid in CSF from patients with MS and found elevated values of all purine nucleotide metabolites, except those of adenosine, which were significantly lower. Thus, the findings of this study suggest that there is an imbalance between ATP production and consumption [125]. Preliminary accounts from our group demonstrated that the activity and expression of NTPDase were increased in lymphocytes from RRMS patients [126]; however, our group showed that NTPDase activity and expression in platelets are decreased in the same population [127]. Taken together, these findings propose that purinergic signaling has an important role in the pathogenesis of MS, possibly by modulating the immune response and influencing the inflammatory status observed in this pathology.

According to recent literature, both $P2X_7$ and P2Y receptors are involved in MS, and the main subtypes implicated in this disease are $P2X_7$, $P2Y_1$, and GPR17 (oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor) [117]. Signaling via the $P2X_7$ receptor ($P2X_7R$) modulates the astrocytic response to inflammation in the CNS from MS patients, and IL-1β induces upregulation of receptor activity since its expression is improved by the presence of IL-1β or TNF-α [128]. The expression of $P2X_7$, upregulated in inflammatory conditions, is elevated in MS patients before axonal lesion formation [129]. Blonda et al. [130] showed that monocytes from MS patients produced vesicles, released by immune cells upon stimulation of the $P2X_7R$, in higher amounts than healthy donors. Although treatment with IFN-β or fingolimod reduced the production of these vesicles, the drug teriflunomide was associated with a downregulation of the purinergic $P2X_7$ receptor. In agreement with this hypothesis, preliminary postmortem studies showed that the $P2X_7R$ is overexpressed both on activated microglia and oligodendrocytes in the brains of MS patients [131]. Oyanguren-Desez et al. [132] revealed $P2RX_7$ gene variants associated with MS, which further increase signaling by $P2X_7R$, contributing to elevation of expression

and function of these receptors in this disease; thus, it could contribute to the formation of new lesions. Genetic and functional data suggest $P2X_7$ as a promising drug target in MS, an inflammatory disease of the CNS [133].

$P2Y_1$ receptors collaborate in neuroprotective mechanisms [117]. This receptor might be stimulated and influence the remyelination processes in MS when high concentrations are released from ATP due to inflammatory conditions [134]. Furthermore, Mildner et al. [135] showed that the receptor $P2Y_{12}$ helps to discriminate activated from quiescent microglia in the human CNS, and a reduction in microglial $P2Y_{12}$ expression in plaque- or lesion-associated myeloid cells was found in MS human brain tissue. In line with previously descriptions, in the cerebral cortex from postmortem MS brains, decreased expression of $P2Y_{12}$ receptors was observed in proximity to demyelinating lesions, and this result was directly correlated with the extent of demyelination in grey matter cortical plaques and subcortical white matter [2].

Other studies demonstrated that IFN-β increases the expression of ecto-5′-nucleotidase in blood-brain barrier endothelium and astrocytes both in vitro and in vivo; moreover, MS patients treated with this drug present an increase in the activity of this enzyme in serum. These results indicate that these therapies target the generation of an increase in extracellular adenosine; therefore, IFN-β is a known anti-inflammatory agent, which promotes endothelial integrity and has neuroprotective properties [136,137].

Importantly, according to preliminary accounts from our group, ADA activity is inhibited in lymphocytes and platelets from patients with RRMS [126,127]. In addition, we found an increase in ADA activity as well as adenosine levels in serum in these patients. Taken together, these findings suggest that rapid deamination of adenosine by ADA may cause a reduction of the levels of this nucleoside in the circulation. Furthermore, an increase in the levels of adenosine, a molecule with immunosuppressive action, may represent a crucial pathway preventing uncontrolled inflammation and an important compensatory mechanism to the immune response in MS [61]. Reinforcing this line of reasoning, the stimulation of lymphocytes from MS patients, which upregulated A_{2A} adenosine receptors causing inhibition of pro-inflammatory cytokines and mediating anti-inflammatory actions, has been reported [138]. Furthermore, adenosine A_1 receptor (A_1AR) expression in both brain and PBMC is diminished in MS patients compared with controls. Thus, this reduction may

have an influence on A_1AR protein levels, leading to increased macrophage activation and CNS inflammation, because the nucleoside adenosine controls the production of proinflammatory molecules such as as TNF-α and IL-6 through its actions on cell surface purine receptors [139].

In this scenario, it is plausible to suggest that the increase in inflammatory processes as well as innate and adaptive immune responses due to the demyelination event that occurs in patients with MS causes alterations in the purinergic signaling pathway in both the CNS and peripheral blood circulation. Thus, considering the multiple physiological changes caused by MS, since this disease can alter the functional properties of various cell types, including lymphocytes, the modulation in the purinergic system present in these cells could contribute to the prevention uncontrolled inflammation in patients with MS. One may therefore speculate that this regulation might reduce the susceptibility for developing new outbreaks.

6.2. Relationship: research in MS animal models and the purinergic system

Studies in animals have revealed a modulatory action of ATP, ADP, and AMP during EAE. In the acute relapses, in the EAE model, the hydrolysis of these nucleotides was decreased in the serum and increased in the spinal cord membrane tissue [140]. With this line of reasoning, recent investigations demonstrated that early after brain injury in rats, ATP hydrolysis rises, producing a decrease in ATP and an increase in AMP levels in the serum. One may therefore speculate that under physiological and pathological conditions, the adenine nucleotides and ectonucleotidases could be the members of a communication network between the brain and the vascular system and probably interfere in the development of several human neuropathologies [113].

Researchers have suggested the involvement of ecto-5′-nucleotidase in the neuroinflammatory process linked with MS [141]. This hypothesis is in agreement with previous findings from our group that verified that in demyelination events, changes occur in 5′-nucleotidase and NTPDase activities in both platelets and synaptosomes from rats experimentally demyelinated by EB and treated with IFN-β. According to these findings, two important enzymes involved in the

thromboregulation process as well as in many pathological conditions in the CNS display altered activities in both the central and peripheral nervous systems after demyelination in the CNS [142,143]. Furthermore, it can also be speculated that a drug widely used to treat MS, IFN-β, is able to regulate adenine nucleotide hydrolysis in platelets as well as in synaptosomes.

Recent evidence indicates that platelets of rats experimentally demyelinated with EB have a reduction in E-NPP activity and an increase in AMP hydrolysis; moreover, after treatment with chlorogenic acid there was a modulation of hydrolysis of adenine nucleotides in platelets of these rats via modification of E-NPP and ecto-5'-nucleotidase activities [47]. These alterations may provide an insight into the involvement of these enzymes in the demyelination process and axonal damage linked to MS [127]. In addition, it is suggested there is a connection between the peripherally initiated adaptive CNS inflammation and astrocytic upregulation of 5'-nucleotidase, which is dependent on the EAE phase [141].

Results of the current study, Lavrnja et al. [141] revealed an increase in the activity and expression of the ecto-5'-nucleotidase in the lumbar spinal cord over the course of EAE, and this upregulation was more pronounced in the symptomatic phase than in the postsymptomatic phase of the disease. Thus, they suggest that this EAE-phase-dependent rise is aimed at the resolution of inflammation, since it implicates enhanced adenosine production. Blaževski et al. [144] suggested that IL-10 might have a significant role in the recovery of rats from EAE, since this interleukin was increased in the CNS-infiltrating immune cells and it stimulated the expression CXCL12 in astrocytes; this chemokine plays important roles in the restriction of inflammation and promotion of myelin repair.

Studies in cultured rat oligodendrocytes identified $P2X_7$ and $P2Y_1$ as the main receptors active in oligodendrocyte progenitor cells [134]; therefore, they interfere in myelination and remyelination processes. Overexpression of $P2X_7R$ was detected in the brain homogenates of EAE rats [121]. In an early study, it was shown that $P2X_7$ activation through ATP can destroy oligodendrocytes and thus, this cell death process contributes to EAE; thereby, treatment with $P2X_7$ antagonists of chronic EAE reduced demyelination and enhanced the associated neurological symptoms [129]. Corroborating these findings, Grygorowicz et al. [53] showed a reduction of astrogliosis and amelioration of neurological symptoms of EAE after the administration of a $P2X_7R$ antagonist. These results could be due to a reduction in

the potentially neurotoxic substances released, such as ATP and glutamate. Therefore, the astroglia can influence in pathogenesis of MS/EAE through purinergic and glutamatergic mechanisms.

A recent study demonstrated important roles for ADP signaling during EAE. They suggested that the downregulation of gene and protein expression of NTPDase2, $P2Y_1$, and $P2Y_{12}$ is associated with symptom severity in EAE [145]. The growing body of literature supports the view that extracellular purine nucleotides and nucleosides play important roles in the immune system and in the inflammatory response to MS/EAE. Therefore, all these statements help to complement the existing knowledge on the involvement of purinergic signaling in the sequence of events leading to MS/EAE, improving our understanding of the complex pathophysiology involved in this disorder (Fig. 2).

7. Conclusions

The data discussed here draw a scenario of an extremely complex pathogenesis of MS. Furthermore, we can already envision that alterations in cholinergic and purinergic signaling contribute to a better understanding of the immunopathogenesis and neurological dysfunction that occurs in this disorder. Thus, the influence of cholinergic and purinergic systems is relevant from clinical and therapeutic perspectives in MS. Therefore, the development of new therapies for MS aiming to regulate the effects these pathways may represent a critical step in the treatment of this neurodegenerative disorder and thus benefit patients with immune-mediated and demyelinating disease.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS/PPSUS 1279-2551/13-7 and FAPERGS/PRONEX termo de outorga no. 16/2551-0000499-4.

REFERENCES

[1] M. Kipp, B. van der Star, D.Y. Vogel , F. Puentes, P. van der Valk, D. Baker, S. Amor, Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond, Mult. Scler. Relat. Disord. 1 (1) (2012) 15-28. http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2011.09.002.

[2] S. Amadio, C. Montilli , R. Magliozzi, G. Bernardi, R. Reynolds, C. Volonté, P2Y12 receptor protein in cortical gray matter lesions in multiple sclerosis, Cereb Cortex 20 (6) (2010) 1263-1273. http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhp193.

[3] O. Aktas, S. Waiczies, F. Zipp, Neurodegeneration in autoimmune demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets, J Neuroimmunol. 184 (1-2) (2007) 17-26. http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.026.

[4] B. Weinstock-Guttman, R. Zivadinov, N. Mahfooz, E. Carl, A. Drake, J. Schneider, B. Teter, S. Hussein, B. Mehta, M. Weiskopf, J. Durfee, N. Bergsland, M. Ramanathan, Serum lipid profiles are associated with disability and MRIoutcomes in multiple sclerosis, J. Neuroinflammation. 8 (2011) 127. http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-8-127.

[5] O. Aktas, B. Kieseier, H.P. Hartung, Neuroprotection, regeneration and immunomo dulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis,Trends Neurosci. 33 (3) (2010) 140- 152. http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2009.12.002.

[6] I. Bjelobaba, D. Savic, I. Lavrnja, Multiple sclerosis and neuroinflammation: The overview of current and prospective therapies, Curr. Pharm. Des. 23 (5) (2017) 693-730. http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666161214153108.

[7] B. Hemmer, M. Kerschensteiner, T. Korn, Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis, Lancet Neurol, 14 (4) (2015) 406-419. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25792099.

[8] D. Ontaneda, A.J. Thompson, R. J. Fox, J. A. Cohen. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function, Lancet, 389 (10076) (2017) 1357-1366. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889191.

[9] R. Milo, A. Miller, Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis, Autoimmun. Rev. 13 (4-5) (2014) 518-524. http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.012.

[10] K. Reinhardt, S. Weiss, J. Rosenbauer, J. Gartnera, R. von Kries, Multiple sclerosis in children and adolescents: incidence and clinical picture-new insights from the nationwide German surveillance (2009–2011), Eur. J. Neurol. 21 (4) (2014) 654-659. http://dx.doi.org/10.1111/ene.12371.

[11] R.M. Ransohoff, D.A Hafler, C.F. Lucchinetti, Multiple sclerosis-a quiet revolution, Nat. Rev. Neurol. 11 (3) (2015) 134-142. http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2015.14.

[12] M. Magyari, Gender differences in multiple sclerosis epidemiology and treatment response, Dan. Med. J. 63 (3) (2016) B5212.

[13] A.I. Figueiredo, C.R.N. Polachini, A.L.C. Prado, Assessment of patients with multiple sclerosis according to tests of the Multiple Sclerosis Functional Composite, Fisioter. Mov. 29 (4) (2016) 677-684. http://dx.doi.org/10.1590/1980-5918.029.004.AO03.

[14] M.A. Chalah, N. Riachi, R. Ahdab, A. Créange, J.P. Lefaucheur, S.S. Ayache, Fatigue in Multiple Sclerosis: Neural Correlates and the Role of Non-Invasive Brain Stimulation, Front. Cell. Neurosci. 9 (2015) 460. http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00460.

[15] V.B. Cavenaghi, F.M. Dobrianskyj, G.S.D. Olival, R.P.C.D. Carneiro, C.P. Tilbery, Characterization of the first symptoms of multiple sclerosis in a Brazilian center: cross-sectional study, Sao Paulo Med. J. 135 (3) (2017) 222-225. http://dx.doi.org/10.1590/1516-3180.2016.0200270117.

[16] R. Lin, B.V. Taylor, S.Jr. Simpson, J. Charlesworth, A.L. Ponsonby, F. Pittas, T. Dwyer, I. van der Mei, Association between multiple sclerosis risk-associated SNPs and relapse and disability--a prospective cohort study, Mult. Scler. 20 (3) (2014) 313-321. http://dx.doi.org/10.1177/1352458513496882.

[17] G. Pan, S.Jr. Simpson, I. van der Mei, J.C. Charlesworth , R. Lucas, A.L. Ponsonby, Y. Zhou, F. Wu, B.V. Taylor, Role of genetic susceptibility variants in predicting clinical course in multiple sclerosis: a cohort study, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 87 (11) (2016) 1204-1211. http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2016-313722.

[18] T. Olsson, L.F. Barcellos, L. Alfredsson, Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis, Nat. Rev. Neurol. 13 (1) (2017) 25-36. http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.187.

[19] M.A. Gianfrancesco, M.M. Glymour, S. Walter, B. Rhead, X. Shao, L. Shen, H. Quach, A. Hubbard, I. Jónsdóttir, K. Stefánsson, P.Strid, J. Hillert, A. Hedström, T. Olsson, I. Kockum, C. Schaefer, L. Alfredsson, L.F. Barcellos, Causal Effect of Genetic Variants Associated With Body Mass Index on Multiple Sclerosis Susceptibility, Am. J. Epidemiol. 185 (3) (2017) 162-171. http://dx.doi.org/10.1093/aje/kww120.

[20] R.A. Marrie, A. Miller, M.P. Sormani, A. Thompson, E. Waubant, M. Trojano, P. O'Connor, K. Fiest, N. Reider, S. Reingold, J.A. Cohen, Recommendations for observational studies of comorbidity in multiple sclerosis, Neurology 86 (15) (2016) 446-1453. http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000002474.

[21] N. Mulakayala, P. Rao, J. Iqbal, R. Bandichhor, S. Oruganti, Synthesis of novel therapeutic agents for the treatment of multiple sclerosis: a briefoverview, Eur. J. Med. Chem 60 (2013) 170-186. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.055.

[22] E.C. Tallantyre, L. Bø, O. Al-Rawashdeh, T. Owens, C.H. Polman, J.S. Lowe, N. Evangelou, Clinico-pathological evidence that axonal loss underlies disability in progressive multiple sclerosis, Mult. Scler. 16 (4) (2010) 406-411. http://dx.doi.org/10.1177/1352458510364992.

[23] Abdel-Aziz K, Schneider T, Solanky BS, Yiannakas MC, Altmann DR, Wheeler-Kingshott CA, Peters AL, Day BL, Thompson AJ, Ciccarelli O, Evidence for early neurodegeneration in the cervical cord of patients with primary progressive multiple sclerosis, Brain 138 (Pt 6) (2015) 1568-1582. http://dx.doi.org/10.1093/brain/awv086.

[24] S.S. Jordy, C.P. Tilbery, M.M. Fazzito, Immunomodulator therapy migration in relapsing remitting multiple sclerosis: a study of 152 cases, Arq. Neuropsiquiatr. 66 (1) (2008) 11-14. http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2008000100004.

[25] D. Karussis, The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review, J. Autoimmun. 48-49 (2014) 134-142. http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.022.

[26] P. Jennum, B. Wanscher, J. Frederiksen, J. Kjellberg, The socioeconomic consequences of multiple sclerosis: a controlled national study, Eur. Neuropsychopharmacol. 22 (1) (2012) 36-43. http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.05.001.

[27] R. Karabudak, K. Karampampa, Z. Calışkan; TRIBUNE Study Group, Treatment experience, burden and unmet needs (TRIBUNE) in MS study: results from Turkey, J. Med. Econ. 18 (1) (2015) 69-75. http://dx.doi.org/10.3111/13696998.2014.950420.

[28] M. Prinz, J. Priller, The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease, Nat. Neurosci. 20 (2) (2017) 136-144. http://dx.doi.org/10.1038/nn.4475.

[29] A.B. Ben-Zacharia, Therapeutics for multiple sclerosis symptoms, Mt. Sinai J. Med. 78 (2) (2011; 176-191. http://dx.doi.org/10.1002/msj.20245.

[30] D.H. Mahad, B.D. Trapp, H. Lassmann, Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis, Lancet Neurol. 14 (2) (2015) 183-193. http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70256-X.

[31] R. Zivadinov, M. Zorzon, R. De Masi, D. Nasuelli, G. Cazzato, Effect of intravenous methylprednisolone on the number, size and confluence of plaques in relapsing-remitting multiple sclerosis, J. Neurol. Sci. 267 (1-2) (2008) 28-35. http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2007.09.025.

[32] R. Yamasaki, T. Matsushita, T.Fukazawa, K. Yokoyama, K. Fujihara, M. Ogino, T. Yokota, K. Miyamoto, M. Niino, K. Nomura, R. Tomioka, M. Tanaka, I. Kawachi, T. Ohashi, K. Kaida, M. Matsui, Y. Nakatsuji, H. Ochi, H. Fukaura, T. Kanda, A. Nagaishi, K. Togo, H. Mizusawa, H. Murai, J. Kira, Efficacy of intravenous methylprednisolone pulse therapy in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica, Mult. Scler. 22 (10) (2016) 1337-1348. http://dx.doi.org/10.1177/1352458515617248.

[33] B. Kretzschmar, H. Pellkofer, M.S. Weber, The Use of Oral Disease-Modifying Therapies in Multiple Sclerosis, Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 16 (4) (2016) 38. http://dx.doi.org/10.1007/s11910-016-0639-4.

[34] G. Lanza, R. Ferri, R. Bella, L. Ferini-Strambi, The impact of drugs for multiple sclerosis on sleep, Mult. Scler. 23 (1) (2017) 5-13. http://dx.doi.org/10.1177/1352458516664034.

[35] L. La Mantia, C. Di Pietrantonj, M. Rovaris, G. Rigon, S. Frau, F. Berardo, A. Gandini, A. Longobardi, B. Weinstock-Guttman, A. Vaona, Interferons-beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis, Cochrane Database Syst. Ver. 11 (2016) CD009333. http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD009333.pub3

[36] L. Lorefice, G. Fenu, J. Frau, G.C Coghe, M.G. Marrosu, E. Cocco, Oral agents in multiple sclerosis, Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem. 14 (1) (2015) 15-25. http://dx.doi.org/10.2174/1871523014999150415130224.

[37] S.K. Lundy, Q. Wu, Q. Wang, C.A. Dowling, S.H. Taitano, G. Mao, Y. Mao-Draayer, Dimethyl fumarate treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis influences B-cell subsets, Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm. 3 (2016) e211. http://dx.doi.org/10.1212/NXI.0000000000000211.

[38] J. Schlöder, C. Berges, F. Luessi, H. Jonuleit, Dimethyl Fumarate Therapy Significantly Improves the responsiveness of T Cells in Multiple Sclerosis Patients for Immunoregulation by Regulatory T Cells, Int. J. Mol. Sci. 18 (2) (2017) E271. http://dx.doi.org/10.3390/ijms18020271.

[39] A. Lee, J. Pike, M.R. Edwards, J. Petrillo, J. Waller, E. Jones, Quantifying the Benefits of Dimethyl Fumarate Over β Interferon and Glatiramer Acetate Therapies on Work Productivity Outcomes in MS Patients, Neurol. Ther. 6 (1) (2017) 79-90. http://dx.doi.org/10.1007/s40120-016-0061-5.

[40] F.A. Rodriguez-Leal, R. Haase, K. Thomas, J.C Eisele, U. Proschmann, T. Schultheiss, R. Kern, T. Ziemssen, Fampridine response in MS patients with gait impairment in a real-world setting: Need for new response criteria?, Mult. Scler. 1 (2017) 1352458517720043. http://dx.doi.org/10.1177/1352458517720043.

[41] T. Ziemssen, C. Prosser, J.S. Haas, A. Lee, S. Braun, P. Landsman-Blumberg, A. Kempel, E. Gleißner, S. Patel, M.Y. Huang, Healthcare resource use and costs of multiple sclerosis patients in Germany before and during fampridine treatment, BMC Neurol. 17 (62) (2017) 2-9. http://dx.doi.org/10.1186/s12883-017-0844-z.

[42] A. Feinstein, J. Freeman, A.C. Lo, Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed, Lancet Neurol. 14 (2) (2015) 194-207. http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70231-5.

[43] J.A. Olsen, E.M. Akirav, Remyelination in multiple sclerosis: cellular mechanisms and novel therapeutic approaches, J. Neurosci. Res. 93 (5) (2015) 687-696. http://dx.doi.org/10.1002/jnr.23493.

[44] B.Y. Choi, J.W. Jung, S.W. Suh, The Emerging Role of Zinc in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis, Int. J. Mol. Sci. 18 (10) (2017) E2070. http://dx.doi.org/10.3390/ijms18102070.

[45] M. Comabella, S.J. Khoury, Immunopathogenesis of multiple sclerosis, Clin. Immunol. 142 (1) (2012) 2-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2011.03.004.

[46] C. Procaccini, V. De Rosa, V. Pucino, L. Formisano, G. Matarese, Animal models of Multiple Sclerosis, Eur. J. Pharmacol. 759 (2015) 182-191. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.042.

[47] C.A. Leal , D.B. Leal, S.A Adefegha, V.M. Morsch, D.V. Beckmann, L.G Castilhos, M.L. Thorstenberg, J.A. Jaques, Vdo. C. Souza, J.G Farias, C.C. Martins, M.R. Schetinger, Effects of chlorogenic acid on adenine nucleotides hydrolyzing enzyme activities and expression in platelets of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide, Biomed. Pharmacother. 81 (2016) 363-370. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.003.

[48] F.B. Carvalho, J.M. Gutierres, C. Bohnert, A.M. Zago, F.H. Abdalla, J.M. Vieira, H.E. Palma, S.M. Oliveira, R.M. Spanevello, M.M. Duarte, S.T. Lopes, G. Aiello, M.G. Amaral, N.L. Pippi, C.M. Andrade, Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination, J. Nutr. Biochem. 26 (4) (2015) 378-390. http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.11.006.

[49] J.R. Kanwar, Anti-inflammatory immunotherapy for multiple sclerosis/experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) disease, Curr. Med. Chem. 12 (25) (2005) 2947-2962. http://dx.doi.org/10.2174/092986705774462833.

[50] D. Trifunović, N. Djedović, I. Lavrnja, K.S. Wendrich, F. Paquet-Durand, D. Miljković, Cell death of spinal cord ED1(+) cells in a rat model of multiple sclerosis, PeerJ 3 (2015) e1189. http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1189.

[51] P. Lu, Y. Cao, M. Wang, P. Zheng, J. Hou, C. Zhu, J. Hu, Mature dendritic cells cause Th17/Treg imbalance by secreting TGF-β1 and IL-6 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, Cent Eur J Immunol. 41 (2) (2016) 143-152. http://dx.doi.org/ 10.5114/ceji.2016.60987

[52] I. Lavrnja, D. Savic, I. Bjelobaba, S. Dacic, I. Bozic, A. Parabucki, N. Nedeljkovic, S. Pekovic, L. Rakic, M. Stojiljkovic, The effect of ribavirin on reactive astrogliosis in experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Pharmacol. Sci. 119 (3) (2012) 221-232. http://doi.org/10.1254/jphs.12004FP.

[53] T. Grygorowicz, M. Wełniak-Kamińska, L. Strużyńska, Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis, Mol. Cell. Neurosci. 74 (2016) 1-9. http://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.02.003.

[54] C. Procaccini, M. Santopaolo, D. Faicchia, A. Colamatteo, L. Formisano, P. de Candia, M. Galgani, V. De Rosa, G. Matarese, Role of metabolismo in

neurodegenerative disorders, Metabolism 65 (9) (2016) 1376-1390. http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2016.05.018.

[55] I. Lavrnja, K. Smiljanic, D. Savic, A. Mladenovic-Djordjevic, K. Tesovic, S. Kanazir, S. Pekovic, Expression profiles of cholesterol metabolism-related genes are altered during development of experimental auto immune encephalomyelitis in the rat spinal cord, Sci. Rep. 7 (2702) (2017) 1-14. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-02638-8.

[56] R.C. Axtell, B.A. de Jong, K. Boniface, L.F. van der Voort, R. Bhat, P. De Sarno, R. Naves, M. Han, F. Zhong, J.G. Castellanos, R. Mair, A. Christakos, I. Kolkowitz, L. Katz, J. Killestein, C.H. Polman, R. de Waal Malefyt, L. Steinman, C. Raman, T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosisand experimental encephalomyelitis, Nat. Med. 16 (4) (2010) 406-412. http://dx.doi.org/10.1038/nm.2110.

[57] P.M. Madsen, S.S. Sloley, A.A. Vitores, M.M. Carballosa-Gautam, R. Brambilla, I.D. Hentall, Prolonged Stimulation of a Brainstem Raphe Region Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Neuroscience 346 (2017) 395-402. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.037.

[58] P.S. Souza, E.D. Gonçalves, G.S. Pedroso, H.R. Farias, S.C. Junqueira, R. Marcon, T. Tuon, M. Cola, P.C.L. Silveira, A.R. Santos, J.B. Calixto, C.T. Souza, R.A. de Pinho, R.C. Dutra, Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Peripheral Immune Response and Blood- Brain Barrier Disruption, Mol. Neurobiol. 54 (6) (2017) 4723-4737. http://doi.org/10.1007/s12035-016-0014-0.

[59] J. Bansi, W. Bloch, U. Gamper, J. Kesselring, Training in MS: influence of two different endurance training protocols (aquatic versus overland) on cytokine and neurotrophin concentrations during three week randomized controlled trial, Mult. Scler. 19 (5) (2013) 613-621. http://dx.doi.org/10.1177/1352458512458605.

[60] T.B. Martins, J.W Rose, T.D. Jaskowski, A.R. Wilson, D. Husebye, H.S. Seraj, H.R. Hill, Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay, Am. J. Clin. Pathol. 136 (5) (2011) 696-704. http://dx.doi.org/10.1309/AJCP7UBK8IBVMVNR.

[61] C.R. Polachini, R.M. Spanevello, E.A. Casali, D. Zanini, L.B. Pereira, C.C. Martins, J. Baldissareli, A.M. Cardoso, M.F. Duarte, P. da Costa, A.L. Prado, M.R Schetinger, V.M. Morsch, Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis, Neuroscience 266 (2014) 266-274. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.048.

[62] M. Di Bari, M. Reale, M. Di Nicola, V. Orlando, S. Galizia, I. Porfilio, E. Costantini, C. D'Angelo, S. Ruggieri, S. Biagioni, C. Gasperini, A.M. Tata, Dysregulated Homeostasis of Acetylcholine Levels in Immune Cells of RR-Multiple

Sclerosis Patients, Int. J. Mol. Sci. 17 (12) (2016) E2009. http://dx.doi.org/10.3390/ijms17122009.

[63] T. Matsushita, T. Tateishi, N. Isobe, T. Yonekawa, R. Yamasaki, D. Matsuse, H. Murai, J. Kira, Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis, PLoS One 8 (4) (2013) e61835. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061835.

[64] M. Gurevich, A. Achiron, The switch between relapse and remission in multiple sclerosis: continuous inflammatory response balanced by Th1 suppression and neurotrophic factors, J. Neuroimmunol. 252 (1-2) (2012) 83-88. http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.07.014.

[65] P. Iwanowski, J. Losy, L. Kramer, M. Wójcicka, E. Kaufman, CXCL10 and CXCL13 chemokines in patients with relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis, J. Neurol. Sci. 380 (2017) 22-26. http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2017.06.048.

[66] M. Boziki, N. Grigoriadis, An update on the role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of multiple sclerosis, Med. Chem. 13 (2017) http://dx.doi.org/10.2174/1573406413666170906122803.

[67] D. Lecca, D. Marangon, G.T. Coppolino, A.M. Méndez, A. Finardi, G.D. Costa, V. Martinelli, R. Furlan, M.P. Abbracchio, MiR-125a-3p timely inhibits oligodendroglial maturation and is pathologically up-regulated in human multiple sclerosis, Sci. Rep. 6 (2016) 34503. http://dx.doi.org/10.1038/srep34503.

[68] B. Wachowicz, A. Morel, E. Miller, J. Saluk, The physiology of blood platelets and changes of their biological activities in multiple sclerosis, Acta Neurobiol. Exp. (Wars) 76 (4) (2016) 269-281.

[69] C.R. Polachini, R.M. Spanevello, D. Zanini, J. Baldissarelli, L.B. Pereira, M.R. Schetinger, I.B. da Cruz, C.E. Assmann, M.D. Bagatini, V.M. Morsch. Evaluation of Delta-Aminolevulinic Dehydratase Activity, Oxidative Stress Biomarkers, and Vitamin D Levels in Patients with Multiple Sclerosis. Neurotox. Res. 29 (2) (2016) 230-242. http://dx.doi.org/10.1007/s12640-015-9584-2.

[70] K. Kawashima, T. Fujii, The lymphocytic cholinergic system and its biological function, Life Sci. 72 (18-19) (2003) 2101- 2109. http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00068-7.

[71] S. Paul, W.K. Jeon, J.L. Bizon, J.S. Han. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. Front Aging Neurosci. 7 (43) (2015) 1-11. http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2015.00043.

[72] W. Jiang, D. Li, R. Han, C. Zhang, W.N. Jin, K. Wood, Q. Liu, F.D. Shi, J. Hao, Acetylcholine- producing NK cells attenuate CNS inflammation via modulation of infiltrating monocytes/macrophages, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 114(30) (2017) E6202-E6211. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1705491114.

[73] S. Darvesh, A.M. Leblanc, I.R. Macdonald, G.A. Reid, V. Bhan, R.J. Macaulay, J.D. Fisk, Butyrylcholinesterase activity in multiple sclerosis neuropathology, Chem. Biol. Interact. 187 (1-3) (2010) 425-431. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.037.

[74] T. Antonelli, M.C. Tomasini, M. Castellazzi, P. Sola, C. Tamborino, D. Ferraro, L. Ferraro E. Granieri, Biological markers in cerebrospinal fluid for axonal impairment in multiple sclerosis: acetylcholinesterase activity cannot be considered a useful biomarker, Neurol. Sci. 34 (5) (2013) 769-771. http://dx.doi.org/10.1007/s10072-012-1265-9.

[75] L. Anglister, A. Etlin, E. Finkel, A.R. Durrant, A. Lev-Tov, Cholinesterases in development and disease, Chem. Biol. Interact. 175 (1-3) (2008) 92-100. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.046.

[76] U.N. Das, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation, Ann. Hepatol. 11 (2012) 409-411.

[77] P.Y. Renard, L. Jean, Probing the cholinergic system to understand neurodegenerative diseases. Future Med Chem 9 (2017) 131-133. http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2016-0213.

[78] K.T. Dineley, A.A. Pandya, J.L. Yakel, Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders, Trends Pharmacol. Sci. 36 (2) (2015) 96-108. http://dx.doi.10.1016/j.tips.2014.12.002.

[79] D. Bertrand, C.H. Lee, D. Flood, F. Marger, D. Donnelly-Roberts, Therapeutic Potential of α7 Nicotinic Acetylcholine Receptors, Pharmacol. Rev. 67 (4) (2015) 1025-1073. http://dx.doi.org/10.1124/pr.113.008581.

[80] T. Fujii, M. Mashimo, Y. Moriwaki, H. Misawa, S. Ono, K. Horiguchi, K. Kawashima, Physiological functions of the cholinergic system in immune cells, J. Pharmacol. Sci. 134 (1) (2017) 1-21. http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002.

[81] E. Nizri, T. Brenner, Modulation of inflammatory pathways by the immune cholinergic system, Amino Acids 45 (1) (2013) 73-85. http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1192-8.

[82] M.R. Picciotto, M.J. Higley, Y.S. Mineur, Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior, Neuron. 76 (1) (2012) 116-129. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036.

[83] Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K, Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells, Life Sci. 91 (21-22) (2012) 981-985. http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.04.031.

[84] K. Kawashima, T. Fujii, Y. Moriwaki, H. Misawa, K. Horiguchi, Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on α7 nAChRs, Int. Immunopharmacol. 29 (1) (2015) 127-134. http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.015.

[85] U.N. Das, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation, Med. Sci. Monit. 13 (2007) 214-221.

[86] L. Santarpia, I. Grandone, F. Contaldo, F. Pasanisi, Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature, J. Cachexia Sarcopenia Muscle, 4(1) (2013) 31-39. http://dx.doi.org/10.1007/s13539-012-0083-5.

[87] E.M. Nicolussi, S. Huck, H. Lassmann, M. Bradl, The cholinergic anti-inflammatory system limits T cell infiltration into the neurodegenerative CNS, but cannot counteract complex CNS inflammation, Neurobiol. Dis. 35 (1) (2009) 24-31. http://dx.doi.10.1016/j.nbd.2009.03.010.

[88] T. Millet, P.L. Roger, N. Eran, B.D. Yael, M. Tehila, B. Talma, Role of the α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and RIC-3 in the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway, Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. 17 (2) (2017) 90-99. http://dx.doi.org/10.2174/1871524916666160829114533.

[89] D.J. van Westerloo, The vagal immune reflex: a blessing from above, Wien. Med. Wochenschr. 160 (5-6) (2010) 112-117. http://dx.doi.org/10.1007/s10354-010-0761-x.

[90] M. Reale, M. Di Bari, M. Di Nicola, C. D'Angelo, F. De Angelis, L. Velluto, A.M. Tata, Nicotinic receptor activation negatively modulates pro-inflammatory cytokine production in multiple sclerosis patients, Int. Immunopharmacol. 29 (1) (2015) 152-157. http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.034.

[91] M. Reale, F. de Angelis, M. di Nicola, E. Capello, M. di Ioia, Gd. Luca, A. Lugaresi, A.M. Tata, Relation between pro-inflammatory cytokines and acetylcholine levels in relapsing-remitting multiple sclerosis patients, Int. J. Mol. Sci. 13 (10) (2012) 12656-12664. http://dx.doi.org/10.3390/ijms131012656.

[92] G. Huang, Y. Wang, P. Vogel, H. Chi, Control of IL-17 receptor signaling and tissue inflammation by the p38α-MKP-1 signaling axis in a mouse model of multiple sclerosis, Sci. Signal. 8 (366) (2015) ra24. http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.aaa2147.

[93] E.J. Kooi, M. Prins, N. Bajic, J.A. Beliën, W.H. Gerritsen, J. van Horssen, E. Aronica, A.M. van Dam, J.J. Hoozemans, P.T. Francis, P. van der Valk, J.J. Geurts, Cholinergic imbalance in the multiple sclerosis hippocampus, Acta Neuropathol. 122 (3) (2011) 313-322. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-011-0849-4.

[94] M.E. Hasselmo, The role of acetylcholine in learning and memory. Curr Opin Neurobiol. 16 (6) (2006) 710-715. http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2006.09.002.

[95] S. Aeinehband, R.P. Lindblom, F. Al Nimer, S. Vijayaraghavan, K. Sandholm, M. Khademi, T. Olsson, B. Nilsson, K.N. Ekdahl, T. Darreh-Shori, F. Piehl, Complement component C3 and butyrylcholinesterase activity are associated with neurodegeneration and clinical disability in multiple sclerosis. PLoS One 10 (4) (2015) e0122048. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122048.

[96] R.P. Lindblom, S. Aeinehband, M. Ström, F. Al Nimer, K. Sandholm, M. Khademi, B. Nilsson, F. Piehl, K.N. Ekdahl, Complement Receptor 2 is increased in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients and regulates C3 function, Clin. Immunol. 166-167 (167) (2016) 89-95. http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2016.04.003.

[97] Y. Li , S. Hai, Y. Zhou, B.R. Dong, Cholinesterase inhibitors for rarer dementias associated with neurological conditions, Cochrane Database Syst. Rev. (3) (2015) CD009444. http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD009444.pub3.

[98] E. Nizri, Y. Hamra-Amitay, C. Sicsic, I. Lavon, T. Brenner, Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors, Neuropharmacology 50 (5) (2006) 540-547. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.10.013.

[99] P.F. Zabrodskii, Effect of acetylcholine on mortality of mice from sepsis and proinflammatory cytokine production, Bull. Exp. Biol. Med. 150 (3) (2011) 340-342.

[100] E. Tyagi, R. Agrawal, C. Nath, R. Shukla, Inhibitory role of cholinergic system mediated via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in LPS-induced neuro-inflammation, Innate Immun. 16 (1) (2010) 3-13. http://dx.doi.org/10.1177/1753425909104680.

[101] R.D. Fields, D.J. Dutta, J. Belgrad, M. Robnett, Cholinergic signaling in myelination, Glia 65 (5) (2017) 687-698. http://dx.doi.org/10.1002/glia.23101.

[102] C.M. Mazzanti, R. Spanevello, L.B. Pereira, J.F. Gonçalves, R. Kaizer, M. Corrêa, M. Ahmed, A. Mazzanti, R. Festugatto, D.L. Graça, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta, Neurochem. Res. 31 (8) (2006) 1027-1034. http://dx.doi.org/10.1007/s11064-006-9112-0.

[103] C.M. Mazzanti, R. Spanevello, M. Ahmed, R. Schmatz, A. Mazzanti, F.Z. Salbego, D.L. Graça, E.S. Sallis, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide, Int. J. Dev. Neurosci. 25 (4) (2007) 259-264. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.02.005.

[104] C.M. Mazzanti, R. Spanevello, M. Ahmed, L.B. Pereira, J.F. Gonçalves, M. Corrêa, R. Schmatz, N. Stefanello, D.B. Leal, A. Mazzanti, A.T. Ramos, T.B. Martins, C.C. Danesi, D.L. Graça, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents, Int. J. Dev. Neurosci. 27 (1) (2009) 73-80. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.09.005.

[105] S. Amadio, S. Apolloni, N. D'Ambrosi, C. Volonté, Purinergic signalling at the plasma membrane: a multipurpose and multidirectional mode to deal with amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis, J. Neurochem. 116 (5) (2011) 796-805. http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07025.x.

[106] G.G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade, Biochim. Biophys. Acta 1783 (5) (2008) 673-694. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.

[107] A.M. Cardoso, M.R. Schetinger, P. Correia-de-Sá, J. Sévigny, Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions, Auton. Neurosci. 191 (2015) 25-38. http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.014.

[108] M. al-Rashida, J. Iqbal, Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydro-lase triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors, Med. Res. Rev. 34 (4) (2014) 703-743. http://dx.doi.org/10.1002/med.21302.

[109] G. Burnstock , Purinergic Signalling and Neurological Diseases: An Update, CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 16 (3) (2017) 257-265. http://dx.doi.org/10.2174/1871527315666160922104848.

[110] M.R. Bono, D. Fernández, F. Flores-Santibáñez, M. Rosemblatt, D. Sauma, CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression, FEBS Lett. 589 (22) (2015) 3454-3460. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027.

[111] A. Gombault, L. Baron, I. Couillin, ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation, Front. Immunol. 3 (2013) 414. http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00414.

[112] M.R. Schetinger, V.M. Morsch, C.D. Bonan, A.T. Wyse, NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health, Biofactors 31 (2) (2007) 77-98. http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520310205.

[113] D. Laketa, J. Savić, I. Bjelobaba, I. Lavrnja, V. Vasić, M. Stojiljković, N. Nedeljković, Brain Injury Alters Ectonucleotidase Activities and Adenine Nucleotide Levels in Rat Serum, J. Med. Biochem. 34 (2) (2015) 215-222. http://dx.doi.org/10.2478/jomb-2014-0025.

[114] H. Zimmermann, M. Zebisch, N. Sträter, Cellular function and molecular structure of ecto- nucleotidases, Purinergic Signal 8 (3) (2012) 437-502. http://dx.doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4.

[115] N.A. Sowa, M.K. Voss, M.J. Zylka, Recombinant ecto-5'-nucleotidase (CD73) has long lasting antinociceptive effects that are dependent on adenosine A1 receptor activation, Mol. Pain 6 (20) (2010) 1-8. http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-6-20.

[116] J.A Ribeiro, A.M. Sebastião, Modulation and metamodulation of synapses by adenosine, Acta Physiol. (Oxf) 199 (2) (2010) 161-169. http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02115.x.

[117] G. Burnstock, Purinergic signalling: past, present and future, Braz. J. Med. Biol. Res. 42 (1) (2009) 3-8. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2008005000037.

[118] F. Jacob, C. Pérez Novo, C. Bachert, K. Van Crombruggen, Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses, Purinergic Signal 9 (3) (2013) 285-306. http://dx.doi.org/10.1007/s11302-013-9357-4.

[119] M. Cieślak, M. Komoszyński, [The role of ecto-purines in inflammation leading to demyelination - new means for therapies against multiple sclerosis], Neurol. Neurochir. Pol. 45 (5) (2011) 489-499. http://doi.org/10.1016/S0028-3843(14)60318-2.

[120] G. Burnstock, Purinergic signalling in neuroregeneration, Neural. Regen. Res. 10 (12) (2015):1919. http://doi.org/10.4103/1673-5374.165300.

[121] T. Grygorowicz, D. Sulejczak, L. Struzynska, Expression of purinergic P2X7 receptor in rat brain during the symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis and after recovery of neurological deficits, Acta Neurobiol. Exp. (Wars) 71(1) (2011) 65-73.

[122] R.A. Cunha, How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? J Neurochem. 139(6) (2016)1019-1055. http://doi.org/10.1111/jnc.13724.

[123] G. Lazzarino, A.M. Amorini, M.J. Eikelenboom, J. Killestein, A. Belli, V. Di Pietro, B. Tavazzi, F. Barkhof, C.H. Polman, B.M. Uitdehaag, A. Petzold, Cerebral fluid ATP metabolites in multiple sclerosis, Mult. Scler. 16 (5) (2010) 549-554. http://dx.doi.org/10.1177/1352458510364196.

[124] B. Tavazzi, A.P. Batocchi, A.M. Amorini, V. Nociti, S. D'Urso, S. Longo, S. Gullotta, M. Picardi, G. Lazzarino, Serum metabolic profile in multiple sclerosis patients, Mult. Scler. Int. 2011 (2011) 1-8. http://dx.doi.org/10.1155/2011/167156.

[125] L. Kuračka, T. Kalnovičová, J. Kucharská, P. Turčáni, Multiple sclerosis: evaluation of purine nucleotide metabolism in central nervoussystem in association with serum levels of s elected fat-soluble antioxidants, Mult. Scler. Int. 2014 (2014) 1-9. http://dx.doi.org/10.1155/2014/759808.

[126] R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, R. Schmatz, G. Thomé, M. Bagatini, M. Correa, C. Rosa, N. Stefanello, L.P. Bellé, M.B. Moretto, L. Oliveira, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients, Clin. Chim. Acta 411 (3-4) (2010) 210-214. http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2009.11.005.

[127] R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, M. Bagatini, M. Correa, R. Schmatz, N. Stefanello, G. Thomé, V.M. Morsch, L. Becker, L. Bellé, L. de Oliveira, M.R. Schetinger, Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets

from multiple sclerosis patients, J. Neurol. 257(1) (2010) 24-30. http://dx.doi.org/10.1007/s00415-009-5258-4.

[128] L. Narcisse, E. Scemes, Y. Zhao, S.C. Lee, C.F. Brosnan, The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7receptor expression and function in human astrocytes, Glia 49 (2) (2005) 245-258. http://dx.doi.org/10.1002/glia.20110.

[129] C. Matute, I. Torre, F. Pérez-Cerdá, A. Pérez-Samartín, E. Alberdi, E. Etxebarria, A.M. Arranz, R. Ravid, A. Rodríguez-Antigüedad, M. Sánchez-Gómez, M. Domercq, P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, J Neurosci. 27 (35) (2007) 9525-9533. http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07025.x.

[130] M. Blonda, A. Amoruso, R. Grasso, V. Di Francescantonio, C. Avolio. Multiple Sclerosis Treatments Affect Monocyte-Derived Microvesicle Production, Front. Neurol. 8 (422) (2017) 1-10. http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2017.00422.

[131] Y. Yiangou, P. Facer, P. Durrenberger, I.P. Chessell,A. Naylor,C. Bountra, R.R. Banati, P. Anand, COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/ macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord, BMC Neurol. 6 (2006) 12. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2377-6-12.

[132] O. Oyanguren-Desez, A. Rodríguez-Antigüedad, P. Villoslada, M. Domercq, E. Alberdi, C. Matute, Gain-of-function of P2X7 receptor gene variants in multiple sclerosis, Cell Calcium 50 (5) (2011) 468-472. http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2011.08.002.

[133] B.J. Gu , J. Field, S. Dutertre, A. Ou, T.J. Kilpatrick, J. Lechner-Scott, R. Scott, R. Lea, B.V. Taylor, J. Stankovich, H. Butzkueven, M. Gresle, S.M. Laws, S. Petrou, S. Hoffjan, D.A. Akkad, C.A. Graham, S. Hawkins, A. Glaser, S.K. Bedri, J. Hillert, C. Matute, A. Antiguedad, ANZgene Consortium, J.S. Wiley, A rare P2X7 variant Arg307Gln with absent pore formation function protects against neuroinflammation in multiple sclerosis, Hum. Mol. Genet. 24 (19) (2015) 5644-5654. http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddv278.

[134] C. Agresti, M.E. Meomartini, S. Amadio, E. Ambrosini, B. Serafini, L. Franchini, C. Volonté, F. Aloisi, S. Visentin, Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocyte progenitor migration and development, Glia. 50(2) (2005) 132-144. http://dx.doi.org/10.1002/glia.20160.

[135] A. Mildner, H. Huang, J. Radke, W. Stenzel, J. Priller, P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases, Glia 65 (2) (2017) 375-387. http://dx.doi.org/10.1002/glia.23097.

[136] L. Airas, J. Niemelä, G. Yegutkin, S. Jalkanen, Mechanism of action of IFN-beta in the treatment of multiple sclerosis: a special

reference to CD73 and adenosine, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1110 (2007) 641-648. http://dx.doi.org/10.1196/annals.1423.067.

[137] J. Niemelä, I. Ifergan, G.G. Yegutkin, S. Jalkanen, A. Prat, L. Airas, IFN-beta regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier, Eur. J. Immunol. 38 (10) (2008) 2718-2726. http://dx.doi.org/10.1002/eji.200838437.

[138] F. Vincenzi, C. Corciulo, M. Targa, S. Merighi, S. Gessi, I. Casetta, M. Gentile, E. Granieri, P.A. Borea, K. Varani, Multiple sclerosis lymphocytes upregulate A2A adenosine receptors that are antiinflammatory when stimulated, Eur. J. Immunol. 43 (8) (2013) 2206-2216. http://dx.doi.org/10.1002/eji.201343314.

[139] J.B. Johnston, C. Silva, G. Gonzalez, J. Holden, K.G. Warren, L.M. Metz, C. Power, Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis, Ann. Neurol. 49 (5) (2001) 650-658. http://dx.doi.org/10.1002/ana.1007.

[140] I. Lavrnja, I. Bjelobaba, M. Stojiljkovic, S. Pekovic, M. Mostarica-Stojkovic, S. Stosic-Grujicic, N. Nedeljkovic, Time-course changes in ectonucleotidase activities during experimental Autoimmune encephalomyelitis, Neurochem. Int. 55 (4) (2009) 193-198. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2009.02.013.

[141] I. Lavrnja, D. Laketa, D. Savic, I. Bozic, I. Bjelobaba, S. Pekovic, N. Nedeljkovic, Expression of a second ecto-5' nucleotidase variant besides the usual protein in symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Mol. Neurosci. 55 (4) (2015) 898-911. http://dx.doi.org/10.1007/s12031-014-0445-x.

[142] R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, R. Kaizer, R. Zanin, D. Cargnelutti, L. Hannel, M. Côrrea, A. Mazzanti, R. Festugatto, D. Graça, M.R Schetinger, V.M. Morsch, Apyrase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon-beta, Neurochem. Res. 31 (4) (2006) 455-462. http://dx.doi.org/10.1007/s11064-006-9039-5.

[143] R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, P.A. Maldonado, R. Zanin, A. Morsch, L Hannel, A. Mazzanti, R. Festugatto, D. Graça, R. Schmatz, V.L. Loro, M.R. Schetinger, V.M. Morsch, Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon-beta, Life Sci. 80 (12) (2007) 1109-1114. http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.049.

[144] J. Blaževski, F. Petković, M. Momčilović, B. Jevtic, D. Miljković, M. Mostarica Stojković, High interleukin-10 expression within the central nervous system may be important for initiation of recovery of Dark Agouti rats from experimental autoimmune encephalomyelitis, Immunobiology 218 (9) (2013) 1192-1199. http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.04.004.

[145] M. Jakovljevic, I. Lavrnja, I. Bozic, D. Savic, I. Bjelobaba, S. Pekovic, J. Sévigny, N. Nedeljkovic, D. Laketa, Down-regulation of NTPDase2 and ADP-

sensitive P2 Purinoceptors Correlate with Severity of Symptoms during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Front Cell Neurosci. 11 (333) (2017) 1-18. http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2017.00333.

Abbreviations:

MS, multiple sclerosis; CNS, central nervous system; ACh, acetylcholine; Th1, type 1 helper T; Th2, T-helper type 2; PRMS, progressive relapsing form of MS; PPMS, primary progressive form MS; SPMS, secondary progressive form of MS; RRMS, relapsing remitting form MS; MRI, magnetic resonance imaging; IgG, immunoglobulin G; CSF, cerebrospinal fluid; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; IFN-β, interferon beta; GA, glatiramer acetate, DMF, dimethyl fumarate; IL, interleukin; HRQoL, health-related quality of life; EMA, European Medicines Agency; EB, ethidium bromide; TMEV, Theiler's murine encephalomyelitis virus; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; INF-γ, interferon-γ; MBP, myelin basic protein; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; PLP, proteolipoprotein; DCs, dendritic cells; Th17, T-helper 17; regulatory T (Treg); CCL4, chemokine (C-C motif) ligand 4; CXCL, C-X-C motif chemokine; MMP, matrix metalloproteinase; IGF-1, insulin-like growth factor-1; ChAT, cholineacetyltransferase; ChT, choline transporter; vAChT, vesicular cholinergic transporter; nAChRs, nicotinic receptors; mAChRs, muscarinic receptors; AChE, acetylcholinesterase; BChE, butyrylcholinesterase; ChEs, cholinesterases; α7 nAChR, alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor; complement component 3, C3; RIC-3, inhibitors of cholinesterase 3; sCR2, soluble complement receptor 2; AChEI, acetylcholinesterase inhibitors; LPS, intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide; ADA, adenosine deaminase; ATP, adenosine triphosphate; UTP, *uridine triphosphate;* ADP, adenosine diphosphate; UDP, *uridine diphosphate;* AMP, adenosine monophosphate; NTPDases, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; NPP, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phospho-diesterase; P1, adenosine-activated type 1 receptor; adenosine A_{2A} receptors, A_{2A}; purinergic receptors $P2X_7$, $P2RX_7$; purinergic receptors $P2Y_1$, $P2RY_1$; purinergic receptors $P2Y_{12}$, $P2RY_{12}$.

Figures

Fig. 1 Overview of the possible influence of the cholinergic system in humans and an animal experimental model of MS.

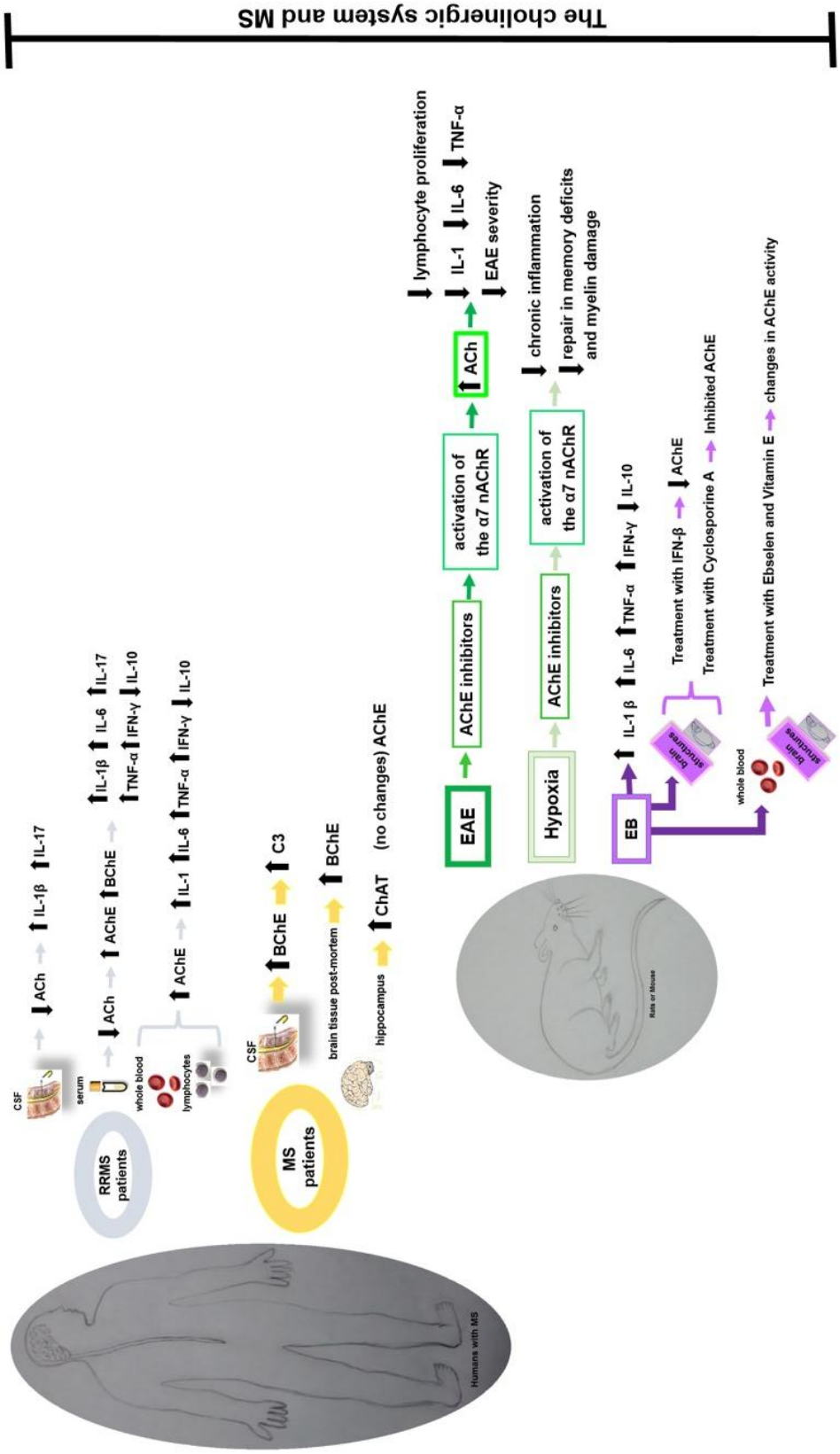
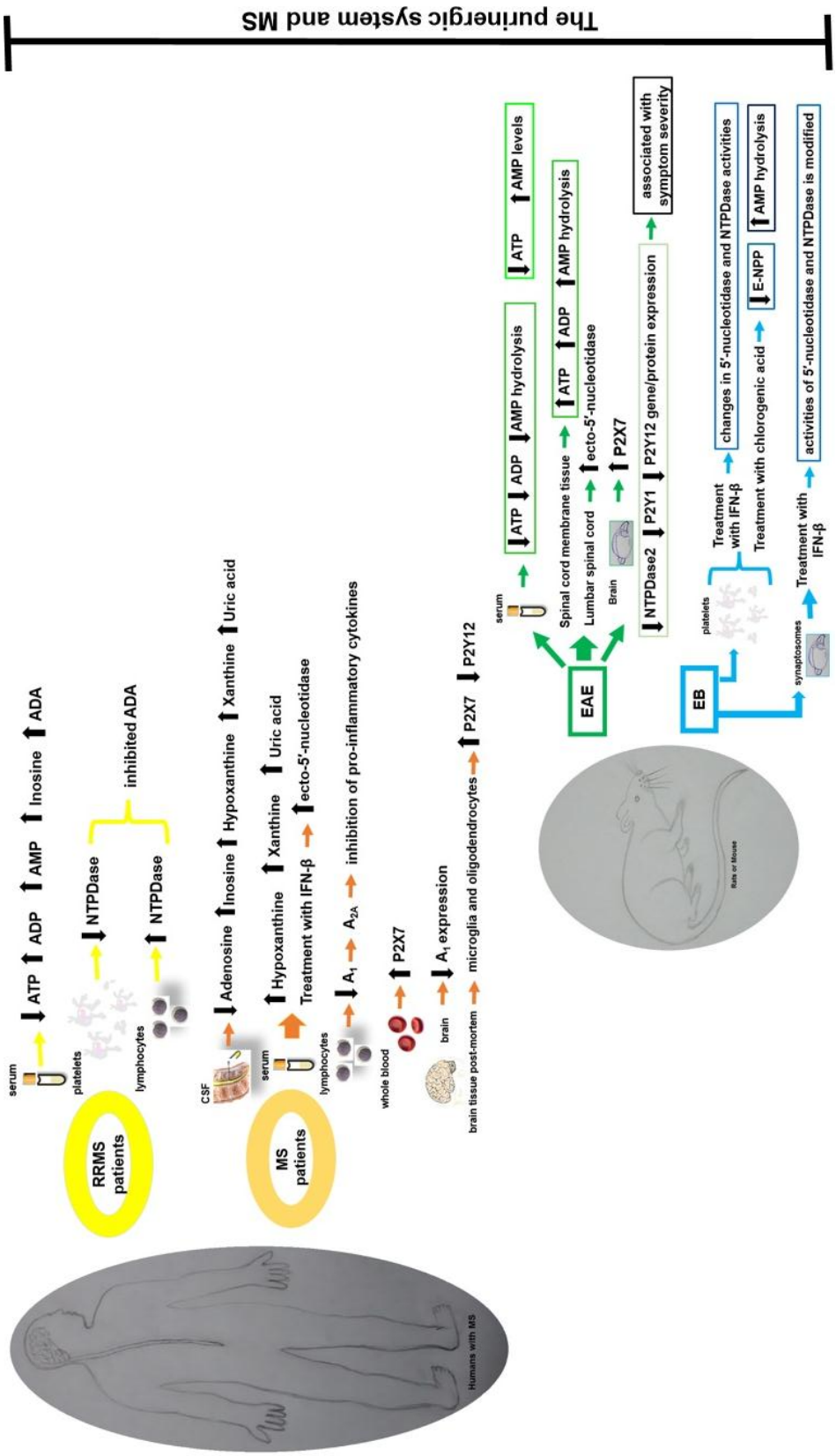


Fig. 2 Schematic representation of possible action mechanisms on the purinergic system in humans and an animal experimental model of MS.



6 DISCUSSÃO

Evidências científicas indicam que a patogênese da EM pode sofrer grande influência da geração de ERO e ERN associadas a disfunção mitocondrial, e dessa forma, contribuir para a neuroinflamação e dano axonal (ORTIZ et al., 2013). O estresse oxidativo pode interferir tanto na fase aguda da EM, sendo responsável por iniciar a inflamação, como na fase crônica sustentando o processo neurodegenerativo (ADAMCZYK; NIEDZIELA; ADAMCZYK-SOWA, 2017). Deste modo, torna-se necessário a busca por biomarcadores sensíveis e específicos para o diagnóstico, acompanhamento, prognóstico e eficácia da terapêutica à EM, uma vez que a resposta dos pacientes as terapias imunomoduladoras é amplamente variável, e o curso da doença é imprevisível (RAPHAEL et al., 2015; TEUNISSEN et al., 2015). Considerando, a influência e os efeitos danosos do estresse oxidativo para fisiopatologia da EM, bem como a necessidade clínica de marcadores do perfil oxidativo para esta doença foram investigados alguns biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com EM e comparados com indivíduos saudáveis (Artigo).

Sabendo-se que a ACh, bem como os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina, ATP e adenosina, liberados durante a inflamação e a desmielinização, são consideradas importantes moléculas durante a ativação do sistema imune, atuando no controle do curso e resolução da resposta inflamatória e imune, buscou-se analisar e discutir a possível influência dos sistemas colinérgico e purinérgico em humanos e modelos experimentais de EM por meio de um estudo de revisão (Manuscrito).

Na EM, os principais responsáveis pelos danos teciduais contínuos ao SNC são a inflamação e o estresse oxidativo (MILLER, 2012). Neste sentido, a degeneração e morte dos neurônios encefálicos que podem ocorrer nos estágios precoces e avançados das doenças neurodegenerativas, geralmente, são resultantes de mecanismos relacionados ao estresse oxidativo (NEGRE-SALYARE et al., 2008). Além disso, a inflamação induzida pela imunidade inata no SNC, leva a uma disfunção primária de astrócitos, acompanhada sequencialmente da desmielinização (SHARMA et al., 2010). Ainda, é importante destacar que na inflamação sistêmica, os efeitos anti-inflamatórios gerados pela ativação do sistema colinérgico, são atingidos por meio da limitação ao aumento abrupto da ativação de citocinas pró-inflamatórias; entretanto, na ausência de estímulos danosos ao

organismo, a estimulação colinérgica provoca uma inibição constante da resposta pró-inflamatória excessiva (ZIVKOVIC et al., 2017).

A ACh, um importante agente imunomodulador, também regula diversos mecanismos como: o ciclo celular, locomoção, atividade elétrica, organização do citoesqueleto, funções tróficas, apoptose, e ainda mecanismos de estresse-resposta-regulação (SHEN et al., 2008). É importante salientar que na EM, a apoptose celular possui efeitos opostos, visto que medeia a morte de oligodendrócitos e neurônios no SNC, ao mesmo tempo que é responsável por determinar a resposta imune e encarregada da manutenção da homeostase do sistema imune, por meio da eliminação de linfócitos T auto-reativos (HAGMAN et al., 2015).

Os resultados encontrados no Artigo demonstraram um aumento significativo dos danos no DNA em leucócitos de pacientes com RREM, sugerindo que esses pacientes têm um maior número de células em processo apoptótico e, por conseguinte, a função dos linfócitos na EM pode estar sendo afetada pela apoptose (GRECCHI et al., 2012). Assim, pode-se sugerir que apesar da EM ser uma doença que atinge o SNC, também ocorrerão modificações na periferia, as quais contribuirão com a piora do quadro clínico.

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho indicam um aumento significativo na peroxidação lipídica, bem como danos as proteínas nos pacientes com RREM. No que diz respeito aos lipídios, cumpre ressaltar que são fundamentais para diversas funções teciduais, tais como armazenamento de energia e sinalização celular, além de serem componentes estruturais das membranas da célula e da mielina (RAFHAEL et al., 2015). Ainda, danos oxidativos a lipídios e proteínas são importantes na fisiopatologia dos distúrbios neurodegenerativos, considerando que produtos da peroxidação lipídica, como o MDA, são neurotóxicos a mitocôndria, resultando em danos mitocodriais, inclusive ao DNA, contribuindo para a neurodegeneração (MAES et al., 2011). Também, a elevação nos níveis dos produtos oriundos da peroxidação lipídica podem vir a ser utilizados na prática clínica como preditores da evolução da EM (TAVAZZI et al., 2011).

Em relação a elevação no conteúdo de carbonilação proteica verificado neste trabalho, o mesmo está de acordo com outros estudos que também encontraram esse aumento em pacientes com EM, e ainda sugerem uma associação com a amplificação da sintomatologia oriunda de disfunções cerebelares (KALLAUR et al.,

2017). Pesquisas apontam um aumento nesse marcador de dano a proteínas no SNC de pacientes com EM, e julgam ser decorrente de níveis reduzidos de antioxidantes, como por exemplo, uma menor concentração de tiois não proteicos (BIZZOZERO et al., 2005).

Esses resultados confirmam possíveis danos as estruturas de biomoléculas em pacientes com RREM. Assim, pode-se sugerir que devido as condições inflamatórias, os níveis de ERO e ERN podem aumentar drasticamente, e por conseguinte, sobrecarregar as defesas antioxidantes levando ao estresse oxidativo, e consequente danos a diferentes estruturas celulares (WACHOWICZ et al., 2016). É importante observar que, a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e os danos no DNA, resultam em disfunção mitocondrial, desequilíbrio iônico, e ainda causam perda da integridade e desestabilização da membrana, esses fatores geralmente, levam a disfunção e/ou morte celular por necrose (VANLANGENAKKER et al., 2008).

Qualquer evento que cause uma agressão e/ou ruptura na membrana plasmática, seja ele transitório ou não, causará a liberação de ATP no ambiente pericelular, já que este está presente no citosol das células dos mamíferos (Di VIRGILIO et al., 2001). Dessa forma, os nucleotídeos extracelulares e a adenosina atuam como moléculas de sinalização no momento de um dano tecidual e consequente processo inflamatório, visto que essas moléculas são liberadas no local da inflamação e/ou ao meio extracelular pela ativação celular, em resposta ao dano celular, exercendo assim seus efeitos sobre a resposta inflamatória e imune (LUTTIKHUIZEN et al., 2004; BURNSTOCK, 2006). A adenosina, usualmente, exibe respostas imunossupressoras visando a proteção dos tecidos saudáveis de estímulos estressantes (BOURS et al., 2006). Neste contexto, foi demonstrado que os pacientes com RREM apresentam um decréscimo na atividade da ADA em linfócitos (SPANEVELLO et al., 2010) concomitante ao aumento dos níveis de adenosina no soro, o que pode representar uma via de prevenção da inflamação descontrolada, característica dessa doença (POLACHINI et al., 2014). Assim, percebe-se que as reações inflamatórias consistem de uma mistura de mecanismos pró- e anti-inflamatórios, sendo dependentes do sistema imunológico (ZIVKOVIC et al., 2017).

A ativação dos $P2X_7R$ desencadeia uma diversidade de respostas que interferem na intensidade e duração das reações imunes inatas e inflamatórias e

esses receptores são amplamente expressos nas células da linhagem hematopoiética, bem como no sistema nervoso (AMADIO, 2017). É importante salientar aqui que os linfócitos T (CD4+ e CD8+), células B e os macrófagos aparecem entre os principais componentes dos infiltrados inflamatórios na EM, estando intimamente relacionados ao aparecimento de lesões desmielinizantes (JUNKER et al., 2007; FRISCHER et al., 2009; COMABELLA; KHOURY, 2012).

Outro importante aspecto a ser ressaltado é que enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO no organismo, conferindo proteção contra os danos oxidativos (van HORSSEN, 2008). Uma provável explicação para a redução na atividade da SOD no sangue de pacientes com RREM (Artigo), é a inativação irreversível desta enzima resultante do estresse oxidativo e seus produtos metabólicos (INAL; KANBAK; SUNAL, 2001; LJUBISAVLJEVIC et al., 2014). Além disso, o decréscimo em sua atividade pode estar colaborando com as alterações oxidativas presentes nesta doença (MILLER et al., 2013). Por outro lado, verificou-se um aumento significativo na atividade da CAT em pacientes com RREM. Esse achado pode refletir um mecanismo compensatório, visto que a SOD está com sua atividade reduzida. Adicionalmente, a atividade da CAT pode estar aumentada, na presença de concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pois essa enzima é uma das responsáveis pela eliminação dessa ERO (MIRSHAFIEY; MOHSENZADEGAN, 2009).

Além disso, nossos resultados mostraram uma redução significativa nos níveis séricos dos antioxidantes não enzimáticos, incluindo vitamina E, vitamina C e tiois não proteicos em soro de pacientes com RREM. Evidências sugerem que a vitamina E, responsável por bloquear a liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos e macrófagos (MORA; IWATA; von ANDRIAN, 2008), é essencial para a função imune, por conseguinte, se em maiores concentrações nas membranas das células pode provocar efeitos benéficos em doenças neurodegenerativas (RICCIARELLI et al., 2007). Desse modo, uma possível explicação para o decréscimo nos níveis de vitamina E em pacientes com RREM, pode ser a busca por contrabalançar a neurodegeneração crônica por meio do maior consumo dessa vitamina (SALEMI et al., 2010), com o objetivo de reduzir a inflamação e dano tecidual mediado pelas células imune (MORA; IWATA; von ANDRIAN, 2008). Ainda, segundo Gutierres et al. (2012), em condições

experimentais, o α-Tocoferol é capaz de modular a hidrólise dos nucleotídeos de adenina no SNC, por meio da regulação da atividade das ectonucleotidades.

A vitamina C participa de várias funções celulares, auxiliando na manutenção da integridade e função de numerosos processos no SNC, incluindo proteção antioxidante, formação de mielina, potencialização sináptica, e ainda proteção contra a toxicidade do glutamato (KOCOT et al., 2017; MORETTI; FRAGA; RODRIGUES, 2017). Dessa forma, os baixos níveis de vitamina C em pacientes com EM pode estar contribuindo para a progressão da doença, já que o reparo, mielinização e a função neural podem estar sendo afetados.

Sabe-se que, a vitamina C é necessária para o processo de reciclagem da vitamina E, sendo essa encarregada da prevenção da peroxidação lipídica por meio da remoção de radicais peroxil (MAY, 2012). Assim, a redução significativa nos níveis das vitaminas C e E, provavelmente esteja influenciando diretamente no aumento em níveis de TBARS encontrado neste estudo. Reforçando essa ideia, os estudos demonstram que os pacientes com EM apresentam níveis significativamente mais baixos de vitamina C, além dessa redução estar associada com o aumento da peroxidação lipídica (KOCOT et al., 2017).

Juntamente com a diminuição nos níveis de antioxidantes não enzimáticos, também observou-se um decréscimo nos níveis de vitamina D em pacientes com EM analisados neste estudo. Recentemente, relatos na literatura têm sugerido que a vitamina D e seus análogos possam, além de prevenir o desenvolvimento de doenças autoimunes, como a EM, serem utilizados no seu tratamento, uma vez que essa vitamina auxilia na modulação do sistema imune (BECKER et al., 2013; ZAHOOR; HAQ, 2017). Essa vitamina é uma importante molécula imunomodulatória, atua nas respostas de vários tipos de células do sistema imune, dentre elas, células T e B, macrófagos e células dendríticas (MORA; IWATA; von ANDRIAN, 2008), bem como no sistema nervoso, exercendo assim, efeitos como a redução do estresse oxidativo, funções neuroprotetoras, ações anti-inflamatórias, imunorregulação, dentre outras (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018). Desse modo, estudos mostram que processos inflamatórios em pacientes com RREM podem ser modulados por essa vitamina, e ainda, juntamente com a vitamina E, estão associadas com biomarcadores inflamatórios nesta população (RØSJØ et al., 2014).

A falta de vitamina D em pacientes com EM, pode contribuir para a progressão da doença, bem como essa insuficiência pode ser considerada um

biomarcador para o provável acréscimo das deficiências; já que independentemente do estado redox desses indivíduos, a carência dessa vitamina está associada ao aumento das incapacidades e progressão da doença (OLIVEIRA et al., 2017). Corroborando com essa hipótese, recentemente, foi demonstrado uma associação entre os baixos níveis de vitamina D e maiores riscos de recidiva da doença em pacientes com RREM (WANG et al., 2018). Além disso, a vitamina D também pode influenciar em mecanismos colinérgicos, e desse modo, regular os níveis ACh uma vez que o calcitriol, forma ativa da vitamina D, pode aumentar a atividade da ChAT e reduzir a atividade da AChE (HUMBLE, 2010).

Outro importante resultado observado neste estudo foi o aumento significativo na atividade da δ-ALA-D em sangue de pacientes com EM, uma importante enzima envolvida no processo de estresse oxidativo, juntamente com outros biomarcadores de estresse oxidativo. Essa enzima faz parte da via de biossíntese do heme, por conseguinte interfere no funcionamento das hemoproteínas, como a hemoglobina, CAT e peroxidases (HEINEMANN; JAHN; JAHN, 2008). Neste contexto, sugere-se que a elevação na atividade desta enzima, está relacionada ao aumento da síntese de heme visando a manutenção da eritropoiese em condições fisiológicas; já que eritropoietina, em processos inflamatórios crônicos pode ter sua função afetada (HAN et al., 2011). Portanto, essa elevação na sua atividade visa contrabalancear o estresse oxidativo, sendo benéfica aos pacientes com EM. Corroborando com essa hipótese, sugere-se a δ-ALA-D, pode ser um importante biomarcador indireto de estresse oxidativo em afecções humanas (VALENTINI et al., 2008; SAUER et al., 2014).

Estudos recentes demonstram que, em geral, os tratamentos com o IFN-β e acetato de glâtiramer, fármacos mais utilizados na terapia da EM, não afetam os biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo, imunes e inflamatórios ou ainda, a progressão da doença (KALLAUR et al., 2017). Sugere-se a minimização dos danos oxidativos, como uma importante estratégia terapêutica para lentificar e/ou interromper os mecanismos de danos a bainha de mielina na EM (WACHOWICZ et al., 2016). Dessa forma, considerando todos os achados mencionados acima, fica evidente a existência de uma relação direta entre os sistemas colinérgico, purinérgico e o estresse oxidativo.

Nesse cenário, fazer uma revisão na literatura das descobertas científicas existentes até o presente momento, envolvendo EM e os sistemas colinérgico e

purinérgico, tornou-se de grande valia. Assim, conforme descrito no Manuscrito, a análise dos resultados de importantes pesquisas publicadas na literatura científica referentes a implicação do sistema colinérgico na EM, mostra que os pacientes com EM apresentam uma redução significativa nos níveis de ACh concomitante a um aumento na atividade da BChE tanto no SNC quanto no soro (DARVESH et al., 2010; REALE et al., 2012; Di BARI et al., 2016). Também, os estudos relatam um aumento significativo na atividade da AChE em sangue, soro e linfócitos dos portadores de RREM (POLACHINI et al., 2014; Di BARI et al., 2016). Estes achados são de grande pertinência, uma vez que sugerem que ACh está sendo degradada mais rapidamente e por conseguinte, seus níveis plasmáticos diminuem, o que pode contribuir para a exacerbação da doença, visto que, essa molécula apresenta propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras.

Além disso, os estudos verificados nessa revisão indicam uma elevação nos níveis de biomarcadores pró-inflamatórios, como as IL-1β, IL-6, IL-17, TNF-α e IFN-γ e uma redução nos níveis da IL-10, tanto em pacientes com RREM como em modelos experimentais animais da doença (POLACHINI et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; HUANG et al., 2015). A partir disso, pode-se inferir que há um processo inflamatório contínuo nesta doença mesmo em fase de remissão, o qual poderá levar ao aparecimento de novos surtos, já que o aumento dos biomarcadores pró-inflamatórios ocorre simultaneamente a redução da IL-10, que possui ação anti-inflamatória. Destaca-se ainda nesta revisão que a inibição da AChE e a ativação dos receptores α7nAChR resulta no aumento da liberação de ACh com consequente redução na atividade inflamatória crônica, bem como diminui os níveis de biomarcadores pró-inflamatórios em modelos experimentais animais (NIZRI; BRENNER, 2013; Li et al., 2015; MILLET et al., 2017). Dessa forma, sugere-se que a ativação seletiva desses receptores pode modular o processo inflamatório contínuo presente nessa doença, e assim, minimizar os danos causados pela mesma.

A influência da sinalização purinérgica nos portadores de EM, bem como em modelos experimentais da doença, também vem sendo amplamente estudada. Dados da literatura demonstram a existência de importantes alterações nos níveis de purinas dos pacientes com EM tanto no SNC como no periférico. Neste contexto, uma redução nos níveis de ATP concomitante ao aumento na atividade da ADA e da ecto-5'-nucletiodase foi encontrado no soro dos indivíduos com EM; já os outros

nucleotídeos de adenina tem seus níveis elevados no soro e no LCR, com exceção do nucleosídeo adenosina que tem uma redução em seus níveis no LCR nessa mesma população (TAVAZZI et al., 2011; KURAČKA et al., 2014; POLACHINI et al., 2014). Essas alterações podem ser resultantes do aumento do metabolismo energético oriundo da disfunção causada pela doença, assim como a adenosina pode estar sendo rapidamente metabolizada na circulação pela ação da ADA.

Destaca-se ainda, nos achados desta revisão, o aumento da expressão dos receptores $P2X_7$, tanto em tecidos encefálicos de pacientes com EM como em modelos experimentais animais, e em monócitos dos portadores da doença (OYANGUREN-DESEZ et al., 2011; GRYGOROWICZ; SULEJCZAK; STRUZYNSKA, 2011; BLONDA et al., 2017). Esses achados demonstram uma condição inflamatória crônica tanto central quanto periférica, que pode estar colaborando com a formação de novas lesões desmielinizantes.

Em suma, todos os dados obtidos nestes estudos evidenciam que a sinalização exercida pelos sistemas colinérgico e purinérgico possui um importante papel na patogênese da EM, uma vez que o desequilíbrio na homeostase dos mesmos resulta em alterações que podem contribuir para os danos celulares tanto no SNC como no SNP. Assim, propõe-se que a modulação desses sistemas pode ser benéfica para os portadores dessa doença. Além disso, pode-se inferir que os efeitos combinados da ação dos sistemas colinérgico e purinérgico, bem como do estresse oxidativo influenciam diretamente na EM.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no Artigo, sugere-se que os pacientes com RREM apresentam danos a estruturas celulares significativos associados a uma redução das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Logo, essas modificações nocivas ao organismo, podem estar contribuindo para um aumento do processo pró-inflamatório e estresse oxidativo nos portadores dessa doença neurodegenerativa. Ao mesmo tempo que a redução dos níveis de vitamina D pode estar relacionado a ocorrência de alterações imunológicas nos portadores de EM. Considerando que, níveis reduzidos dessa molécula podem comprometer as funções imunomodulatórias e anti-inflamatórias e, desta maneira, favorecer o desenvolvimento de novos surtos, com consequente, aumento dos comprometimentos oriundos desta doença. Neste cenário, pode-se concluir que níveis insuficientes de vitamina D, danos ao DNA e o estresse oxidativo podem estar colaborando para o desenvolvimento e progressão da EM.

Por outro lado, é relevante salientar que o aumento da atividade da δ-ALA-D pode representar um importante mecanismo de defesa do organismo, na tentativa de manter o metabolismo celular e de reduzir o estresse oxidativo.

Além disso, após uma ampla revisão na literatura científica, é plausível sugerir que os sistemas colinérgicos e purinérgicos são relevantes na EM, tanto do ponto de vista clínico quanto terapêutico. Desse modo, o desenvolvimento de novas terapias visando regular os efeitos dessas vias, pode ser de grande importância no tratamento da EM. Assim, como a possível, padronização de alguns constituintes desse sistema, como biomarcadores para auxiliar na avaliação e acompanhamento clínico desse distúrbio crônico e neurodegenerativo, em benefício, e com consequente ganho de qualidade de vida dos pacientes com essa doença imunomediada e desmielinizante.

Em conjunto, todos esses resultados são de suma importância, pois sugerem que os pacientes com EM, mesmo em uma fase de remissão apresentam uma alteração inflamatória sistêmica com aumento dos pró-oxidantes em detrimento aos antioxidantes. Além disso, parecem existir mecanismos tentando promover uma resposta compensatória do organismo frente as alterações inflamatórias e imunes, entretanto, a prevalência do estado pró-inflamatório e pró-oxidante é constante. Assim, sugere-se que situações de elevada demanda das funções do sistema imune possam desencadear o surto.

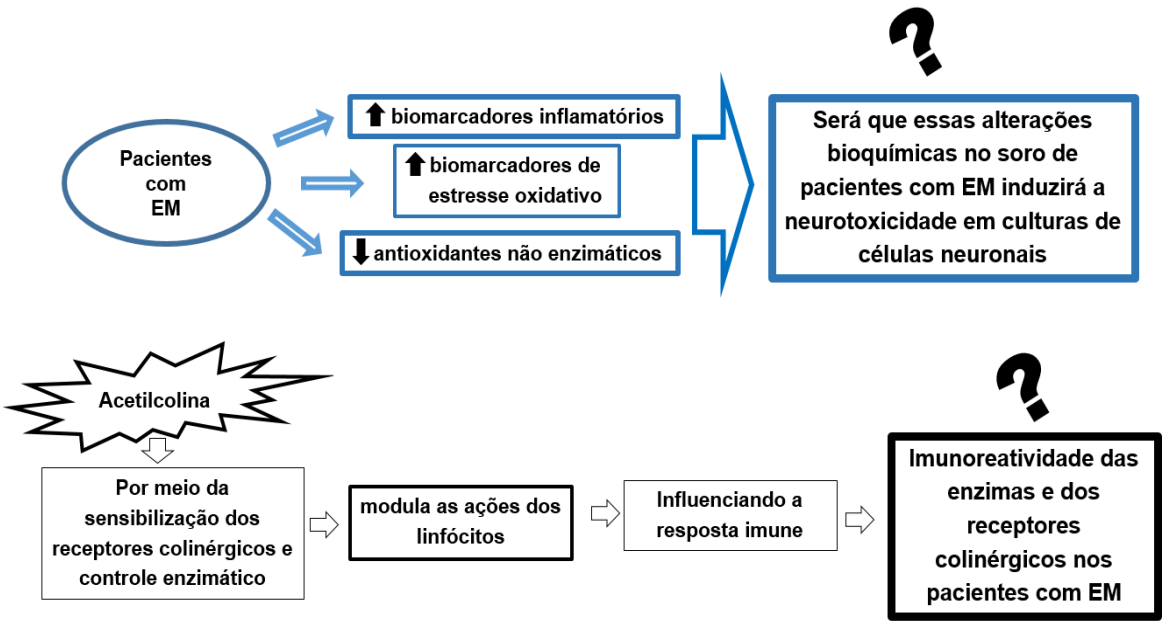
8 PERSPECTIVAS

Algumas perspectivas para estudos futuros podem ser demonstradas na Figura 12 e incluem:

- Avaliar se as alterações bioquímicas no soro de pacientes com EM induzem a neurotoxicidade nas culturas de células neuronais;

- Investigar a imunoreatividade das enzimas AChE e colina acetiltransferase (ChAT), e dos receptores colinérgicos mAChR e nAChR em linfócitos de pacientes com EM e controles.

Figura 12 – Perspectivas para estudos futuros envolvendo biomarcadores, sistema colinérgico e pacientes com esclerose múltipla



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZYK, B.; NIEDZIELA, N.; ADAMCZYK-SOWA, M. Novel Approaches of Oxidative Stress Mechanisms in the Multiple Sclerosis Pathophysiology and Therapy. **Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; Chapter 10**, nov. 2017.

ADONI, T. Multiple sclerosis, fatigue and sleep disorders: beyond the clinical relapses. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 74, n. 6, p. 431-432, jun. 2016.

AHAMED, M.; SIDDIQUI, M.K. Environmental lead toxicity and nutritional factors. **Clinical Nutrition,** v. 26, n. 4, p. 400-408, ago. 2007.

AHARONI, R. Immunomodulation neuroprotection and remyelination - the fundamental therapeutic effects of glatiramer acetate: a critical review. **Journal of Autoimmunity,** v. 54, p. 81-92, nov. 2014.

Al-KHAMIS, F. A. The use of immune modulating drugs for the treatment of multiple sclerosis. **Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)**, v. 21, n. 1, p. 4-9, jan. 2016.

ALMEIDA, L. H. R.B. et al. Ensinando e aprendendo com portadores de Esclerose Múltipla: relato de experiência. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 4, p. 460-463, jul./ago. 2007.

AMADIO, S. et al. Modulation of P2X7 Receptor during Inflammation in Multiple Sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-17, nov. 2017.

AMATO, M. P. et al. Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016 ECTRIMS focused workshop. **Multiple Sclerosis**, [DOI: 10.1177/1352458516686847], p. 1-14, jan. 2017.

ANGLISTER, L. et al. Cholinesterases in development and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1-3, p. 92-100, set. 2008.

ANTONIOLI, L. et al. The role of purinergic pathways in the pathophysiology of gut diseases: pharmacologicalmodulation and potential therap eutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 157-188, ago. 2013.

BAIERLE, M. Are delta-aminolevulinate dehydratase inhibition and metal concentrations additional factors for the age-related cognitive decline? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10851-10867, out. 2014.

BAR-Or, A. et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?. **Annals of Neurology**, v. 67, n. 4, p. 452-461, abr. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-23, jan./fev. 2006.

BEAMER, E. et al. Purinergic mechanisms in neuroinflammation**:** An update from molecules to behavior. **Neuropharmacology,** v. 104, p. 94-104, mai. 2016.

BECKER, J. et al. Season of birth as a risk factor for multiple sclerosis in Brazil. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 329, n. 1-2, p. 6-10, jun. 2013.

BELMAN, A. L. et al. Characteristics of Children and Adolescents With Multiple Sclerosis. **Pediatrics**, v. 138, n. 1, p. 1-8, jul. 2016.

BEN-ZACHARIA, A. B. Therapeutics for Multiple Sclerosis Symptoms. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 78, n. 2, p. 176-191, mar./abr. 2011.

BERTOTTI, A. P.; LENZI, M. C. R.; PORTES, J. R. M. O portador de esclerose múltipla e suas formas de enfrentamento frente à doença. **Barbarói**, n. 34, p. 101-123, jan./jul. 2011.

BESLER, H. T.; COMOĞLU, S.; OKÇU, Z. Serum levels of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in multiple sclerosis. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 215-220, jun. 2002.

BETTENCOURT, A. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in multiple sclerosis patients from the north of Portugal. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular biology**, [DOI 10.1016/j.jsbmb.2017.09.016], set. 2017.

BHAT, R.; STEINMAN, L. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 123-132, out. 2009.

BIZZOZERO, O. A. Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, n. 5, p. 687-695, set. 2005.

BLONDA, M. et al. Multiple Sclerosis Treatments Affect Monocyte-Derived Microvesicle Production. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. 422, p. 1-10, ago. 2017.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse médicale,** v. 31, n. 25, p. 1174-1184, jul. 2002.

BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 2, p. 269-278, jun. 2006.

BORSELLINO, G. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3^{+} Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, v. 4, p. 1225-1232, ago. 2017.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, nov. 2006.

BOVE, R.; CHITNIS, T. The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 20, n. 5, p. 520-526, abr. 2014.

BRASIL. Governo do brasil. **Saúde> 2017> 08> Esclerose múltipla**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/08/sus-oferece-tratamento-clinico-e-reabilitacao-a-pacientes-com-esclerose-multipla>. Acesso em: 14 dez. 2017.

BRENNER, T. et al. Acetylcholinesterase inhibitors and cholinergic modulation in Myasthenia Gravis and neuroinflammation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 201-202, p. 121-127, set. 2008.

BROLA, W. et al. Association of seasonal serum 25-hydroxyvitamin D levels with disability and relapses in relapsing-remitting multiple sclerosis. **European journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 9, p. 995-999, set. 2016.

BROLA, W.; SOBOLEWSKI, P.; FLAGA, S. et al. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in central Poland, 2010-2014. **BMC Neurology**, v. 16, n. 134, p. 1-7, ago. 2016.

BROWNLEE, W. J. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. **Lancet**, v. 389, n. 10076, p. 1336-1346, abr. 2017.

BURNSTOCK, G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurode generation, neuroprotection and neuroregeneration. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 4-17, mai. 2016.

_____. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 58-86, mar. 2006.

_____. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, n. 12, p. 1471-1483, jun. 2007.

_____. Purinergic signalling: from discovery to current developments. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 1, p. 16-34, jan. 2014.

BUTTMANN, M.; KAVERI, S.; HARTUNG, H. P. Polyclonal immunoglobulin G for autoimmune demyelinating nervous system disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 8, p. 445-457, ago. 2013.

CALVO-BARREIRO, L. et al. Combined therapies to treat complex diseases: The role of the gut microbiota in multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, [DOI: 10.1016/j.autrev.2017.11.019], nov. 2017.

CAMEROTA, F. et al. Focal muscle vibration, an effective rehabilitative approach in severe gait impairmentdue to multiple sclerosis. **Journal of Neurological Sciences**, v. 372, p. 33-39, jan. 2017.

CARDOSO, E. et al. Clinical and epidemiological profile of multiple sclerosis in a reference center in the State of Bahia, Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 3B, p. 727-730, set. 2006.

CARNEVALE, D.; DE SIMONE, R.; MINGHETTI, L. Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. **CNS & Neurogical Disorders Drug Targets**, v. 6, n. 6, p. 388-397, dez. 2007.

CARVALHO, A. N. et al. Glutathione in multiple sclerosis: more than just an antioxidant? **Multiple Sclerosis**, v. 20, n. 11, p. 1425-1431, out. 2014.

CARVALHO, F. B. et al. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 378-390, abr. 2015.

CHAVAN, S. S.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. **Immunity**, v. 46, n. 6; p. 927-942, jun. 2017.

CHEN, Y. et al. The oligodendrocyte -specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. **Nature Neuroscience**, v.12, n. 11, p. 1398-1406, nov. 2009.

CHOI, B. Y.; JUNG, J. W.; SUH, S. W. The Emerging Role of Zinc in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 10, p. 1-11, set. 2017.

CHOI, I. Y. et al. In vivo evidence of oxidative stress in brains of patients with progressive multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 1:1352458517711568, jun. 2017.

CICCARELLI, O. et al. Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. **The Lancet. Neurology**, v. 13, n. 8, p. 807-822, ago. 2014.

COMABELLA, M.; KHOURY, S. J. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical Immunology**, v. 142, n. 1, p. 2-8, jan. 2012.

COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1502-1517, out. 2008.

CORDERO, O. J. et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, n. 6, p. 920-930, dez. 2001.

CORREALE, J.; MELI, F.; YSRRAELIT, C. [Neuronal injury in multiple sclerosis]. **Medicina**. v. 66, n. 5, p. 472-485, 2006.

CORREALE, J.; VILLA, A. Cellular elements of the blood-brain barrier. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 12, p. 2067-2077, dez. 2009.

COSTA, C. C. R. et al. Adoecimento do portador de esclerose múltipla: percepções e vivências a partir da narrativa de dois casos clínicos. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Fortaleza, v. 18, n. 3, p. 117-124, 2005.

COVO, P. Introducción a la historia de la esclerosis múltiple. **Acta Neurológica Colombiana**, v. 31, n. 1, p. 119-124, jan. 2015.

CUNHA, R. A. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. 6, p. 1019-1055, dez. 2016.

da GAMA PEREIRA, A. B. C. N. et al. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 4, n. 6, p. 572-579, nov. 2015.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406; abr./jun. 2006.

DALLI, J.; SERHAN, C. N. Immunoresolvents signaling molecules at intersection between the brain and immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 48-54, nov. 2017.

DARVESH, S. et al. Butyrylcholinesterase activity in multiple sclerosis neuropathology. **Chemico- Biological Interactions**, v. 187, n. 1-3, p. 425-431, set. 2010.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 12, p. (RA214-21), dez. 2007.

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

de OLIVEIRA, P. et al. Cell-specific regulation of acetylcholinesterase expression under inflammatory conditions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 51, n. 2, p. 129-137, 2012.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory Tcells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257-1265, jun. 2007.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L. Immunomodulation in multiple sclerosis: promises and pitfalls. **Current Opinion in Immunology**, v. 49, p. 37-43, dez. 2017.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545-558, set. 2015.

Di BARI, M. et al. Dysregulated Homeostasis of Acetylcholine Levels in Immune Cells of RR-Multiple Sclerosis Patients. I**nternational Journal of Molecular Science**, v. 17, n. 12, nov. 2016.

Di PERRI, T.; LAGHI-PASINI, F. Pathophysiology and pharmacology of the adenosine system. **Annali Italiani di Medicina Interna**, v. 6, n. 4 (Pt 2), p. 442-447, out./dez. 1991.

Di VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587-600, fev. 2001.

Di VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: basic & clinical**, v. 191, p. 117-123, set. 2015.

DJORDJEVIĆ, V. B.; ZVEZDANOVIĆ, L.; COSIĆ, V. Oxidative stress in human diseases. **Srpski arhiv za celokupno lekarstvo**, v. 136, n. Suppl 2, p.158-65, mai. 2008.

DOMINGUES, R. B.; FERNANDES, G. B. P.; LEITE, F. B. V. M. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: far beyond the bands. **Einstein (São Paulo)**, v. 15, n. 1, p. 100-104, jan./mar. 2017.

EAGLE, T. et al. Treatment satisfaction across injectable, infusion, and oral disease-modifying therapies for multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 18, p. 196-201, nov. 2017.

EGWUAGU, C. E.; LARKIN III, J. Therapeutic targeting of STAT pathways in CNS autoimmune diseases. **JAK-STAT**, v. 2, n. 1(e24134-1), jan./mar., 2013.

EIKVAR, L.; KIRKEBØEN, K. A. [Receptor mediated effects of adenosine and caffeine]. **Tidsskrift for den Norske Laegeforen**, v. 118, n. 9, p. 1390-1395, mar. 1998.

EMAMGHOLIPOUR, S. et al. Evidence for possible role of melatonin in reducing oxidative stress in multiple sclerosis through its effect on SIRT1 and antioxidant enzymes. **Life Sciences**, v. 145, p. 34-41, jan. 2016.

FARINA, M. et al. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinate dehydratase from mouse liver, kidney and brain. **Toxicology Letters**, v. 139, n. 1, p. 55-66, mar. 2003.

FETISOVA, E. et al. Mitochondria-targeted Antioxidants as a Prospective Therapeutic Strategy for Multiple Sclerosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 19, p. 2086-2114, 2017.

FIELDS, R. D. et al. Cholinergic signaling in myelination. **Glia**, v. 65, n. 5, p. 687-698, mai. 2017.

FILIPPI, M.; ROCCA, M. A. Multiple sclerosis: new measures to monitor the disease. **The Lancet. Neurology**, v. 12, n. 1, p. 12-13, jan. 2013.

FINKELSZTEJN, A. et al. Clinical Features of Multiple Sclerosis in the South of Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 67, n. 4, p. 1071-75, ago. 2009.

_____. The prevalence of multiple sclerosis in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 72, n. 2, p. 104-106, fev. 2014.

FISCHER, M. T. et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. **Brain**, v. 136, n. (Pt 6), p. 1799-1815, jun. 2013.

FRISCHER, J. M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Brain**, v. 132, n. (Pt 5), p. 1175-1189, mai. 2009.

FUJII, T. et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 134, n. 1, p. 1-21, mai. 2017.

GABY, A. Multiple sclerosis. **Global Advances in Health and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 50-56, jan. 2013.

GAFSON, A.; GIOVANNONI, G.; HAWKES, H. C. The diagnostic criteria for multiple sclerosis: From Charcot to McDonald. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 1, n. 1, p. 9-14, jan. 2012.

GANESH, A.; STAHNISCH, F. W. A history of multiple sclerosis investigations in Canada between 1850 and 1950. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 41, n. 3, p. 320-332, mai. 2014.

GARG, N.; SMITH, T. W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. **Brain and Behavior**, v. 5, n. 9, set. 2015.

GASPAR, H. B. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. **Science Translation Medicine**, v. 3, n. 97, p. (97ra80), ago. 2011.

GIL, Á.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: Classic and Novel Actions. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 72, n. 2, p. 87-95, jan. 2018.

GIOVANNONI, G. Management of secondary-progressive multiple sclerosis. **CNS Drugs**, v. 18, n. 10, p. 653-669, 2004.

GOLDENBERG, M. M. Multiple sclerosis review. **Pharmacy and Therapeutics,** v. 37, n. 3, p. 175-184, mar. 2012.

GOMBAULT, A.; BARON, L.; COUILLIN, I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 414, p. 1-6, jan. 2013.

GOMES, C. V. et al. Adenosine receptors and brain diseases:neuroprotection and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, n. 5, p. 1380-1399, mai. 2011.

GOODIN, D. S. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 138, p. 173-206, 2016.

GRECCHI, S. et al. Search for cellular stress biomarkers in lymphocytes from patients with multiple sclerosis: a pilot study. **PLoS One**, v. 7, n. 9, set. 2012.

GREIG, N. H.; REALE, M.; TATA, A. M. New pharmacological approaches to the cholinergic system: an overview on muscarinic receptor ligands and cholinesterase inhibitors. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 123-141, ago. 2013.

GRYGOROWICZ, T.; SULEJCZAK, D.; STRUZYNSKA, L. Expression of purinergic P2X7 receptor in rat brain during the symptomatic phase of experimental autoimmune encephalomyelitis and after recovery of neurological deficits. **Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars)**, v. 71, n. 1, p. 65-73, 2011.

GUTIERRES, J. M. α-Tocopherol regulates ectonucleotidase activities in synaptosomes from rats fed a high-fat diet. **Cell Biochemistry and Function**, v. 30, n. 4, p. 286-292, jun. 2012.

HAGMAN, S. et al. Analysis of apoptosis-related genes in patients with clinically isolated syndrome and their association with conversion to multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 280, p. 43-48, mar. 2015.

HAIDER, L. Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-10, mai. 2015.

HAMMER, L. A.; ZAGON, I. S.; MCLAUGHLIN, P. J. Treatment of a relapse-remitting model of multiple sclerosis with opioid growth factor. **Brain Research Bulletin**, v. 98, p. 122-131, set. 2013.

HAN, B.; LI, X.; HAO, J. The cholinergic anti-inflammatory pathway: An innovative treatment strategy for neurological diseases. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 77, p. 358-368, jun. 2017.

HAN, X. et al. Effect of erythropoietin on proinflammatory factors of human monocytes and its mechanisms. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 19, n. 3, p. 738-743, jun. 2011.

HANWELL, H. E. C.; BANWELL, B. Assessment of evidence for a protective role of vitamin D in multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, n. 2, p. 202-212, fev. 2011.

HARBO, H. F.; GOLD, R.; TINTORE, M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 6, n. 4, p. 237-248, jul. 2013.

HEIDKER, R. M.; EMERSON, M. R.; LeVINE, S. M. Metabolic pathways as possible therapeutic targets for progressive multiple sclerosis. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 8, p.1262-1267, ago. 2017.

HEINEMANN, I. U.; JAHN, M.; JAHN, D. The biochemistry of heme biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 474, n. 2, p. 238-251, jun. 2008.

HEMMER, B.; KERSCHENSTEINER, M.; KORN, T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 4, p. 406-419, abr. 2015.

HOOVER, D. B. Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 179, p. 1-16, nov. 2017.

HOWARD, J.; TREVICK, S.; YOUNGER, D. S. Epidemiology of Multiple Sclerosis. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 919-939, nov. 2016.

HUANG, G. et al. Control of IL-17 receptor signaling and tissue inflammation by the p38α-MKP-1 signaling axis in a mouse model of multiple sclerosis. **Science Signaling**, v. 8, n. 366, p. (ra24), mar. 2015.

HUMBLE, M. B. Vitamin D, light and mental health. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, n. 2, p. 142-49, nov. 2010.

HUNSUCKER, S. A.; MITCHELL, B. S.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, n. 1, p. 1-30, jul. 2005.

HUPPERT, J. et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 4, p. 1023-1034, abr. 2010.

HUYNH, J. L.; CASACCIA, P. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment. **The Lancet. Neurology**, v. 12, n. 2, p. 195-206, fev. 2013.

INAL, M. E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta**, v. 305, n. (1-2), p. 75-80, mar. 2001.

JIANG, W. et al. Acetylcholine-producing NK cells attenuate CNS inflammation via modulation of infiltrating monocytes/macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 114, n. 30, p. (E6202-E6211), jul. 2017.

JOHNEN, A. et al. Distinct cognitive impairments in different disease courses of multiple sclerosis- A systematic review and meta-analysis, **Neuroscience Biobehavior Reviews**, [doi:10.1016/j.neubiorev.2017.09.005], set. 2017.

JORDY, S. S.; TILBERY, C. P.; FAZZITO, M. M. Immunomodulator therapy migration in relapsing remitting multiple sclerosis: a study of 152 cases**. Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 66, n. 1, p. 11-14, mar. 2008.

JUNKER, A. et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. **Brain**, v. 130, n. (Pt 11), p. 2789-2799, nov. 2007.

KALA, M.; MIRAVALLE, A.; VOLLMER, T. Recent insights into the mechanism of action of glatiramer acetate. **Journal of Neuroimmunology**, v. 235, n. (1-2), p. 9-17, jun. 2011.

KALKMAN, H. O.; FEUERBACH, D. Modulatory effects of α7 nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 73, n. 13, p. 2511-2530, jul. 2016.

KALLAUR, A. P. et al. Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 31-44, jan. 2017.

KANTARCI, O. H.; WEINSHENKER, B. G. Natural history of multiple sclerosis. **Neurologic Clinics**, v. 23, n. 1, p. 17-38, fev. 2005.

KARG, E. et al. Nonenzymatic antioxidants of blood in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 246, n. 7, p. 533-539, jul. 1999.

KARUSSIS, D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. **Journal of Autoimmunity**, v. 48-49, p. 134-142, fev./mar. 2014.

KAUNZNER, U. W.; AL-KAWAZ, M.; GAUTHIER, S. A. Defining Disease Activity and Response to Therapy in MS. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 19, n. 5, mai. 2017.

KAWASHIMA, K. et al. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on α7 nAChRs. **International Immunopharmacology**, v. 29, n. 1, p.127-134, nov. 2015.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Expression of non-neuronal acetylcholine in limphocytes and its contribution to the regulation of the immune function. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 2063-2085, set. 2004.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 1, p. 29-48, abr. 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function**. Life Sciences**, v. 72, n. 18-19, p. 2101-2109, mar. 2003.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1173-1175, out. 2007.

KES, V. B. Quality of life in patients with multiple sclerosis. **Acta Clinica Croatica**, v. 52, n. 1, p. 107-11, mar. 2013.

KHADEMI, M. et al. Intense Inflammation and Nerve Damage in Early Multiple Sclerosis Subsides at Older Age: A Reflection by Cerebrospinal Fluid Biomarkers, **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. 1-12, mai. 2013.

KIESEIER, B. C. The mechanism of action of interferon-β in relapsing multiple sclerosis. **CNS Drugs**, v. 25, n. 6, p. 491-502, jun. 2011.

KINGWELL, E. et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. **BMC???? Isso não e abreviação, não tem nome por extenso? Neurology**, v. 13, n. 128, set. 2013.

KOCOT, J. et al. Does Vitamin C Influence Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders? **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 1-29, jun. 2017.

KOLBER, P. et al. Identification of cortical lesions using DIR and FLAIR in early stages of multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 262, n. 6, p. 1473-1482, jun. 2015.

KOUTSOURAKI, E.; COSTA, V.; BALOYANNIS, S. Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: a review. **International of Review of Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 2-13, 2010.

KRETZSCHMAR, B.; PELLKOFER, H.; WEBER, M. S. The Use of Oral Disease-Modifying Therapies in Multiple Sclerosis. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 16, n. 4, abr. 2016.

KURAČKA, L. et al. Multiple sclerosis: evaluation of purine nucleotide metabolism in central nervous system in association with serum levels of selected fat-soluble antioxidants. **Multiple Sclerosis International**, v. 2014, p. 1-9, mai. 2014.

KUTZELNIGG, A.; LASSMANN, H. Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. **Handbook of clinical neurology**, v. 122, p. 15-58, 2014.

LAMPÓN, N. et al. Association between butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. **Annals of Hepatology**, v. 11, n. 3, p. 356-363, mai./jun. 2012.

LANGER, D. et al. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. **Cell and Tissue Research**, v. 334, n. 2, p. 199-217, nov. 2008.

LASSMANN, H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models. **Experimental Neurology**, v. 225, n. 1, p. 2-8, set. 2010.

_____. Targets of therapy in progressive MS. **Multiple Sclerosis**, v. 23, n. 12, p. 1593-1599, out. 2017.

LASSMANN, H.; van HORSSEN, J.; MAHAD, D. Progressive multiple sclerosis: Pathology and pathogenesis. **Nature Reviews. Neurology**, v. 8, n. 11, p. 647-656, nov. 2012.

LAUER, K. Notes on the epidemiology of multiple sclerosis, with special reference to dietary habits**. International Journal of Molecular Sciences,** v. 15, n. 3, p. 3533-3545, fev. 2014.

LAYER, G. et al. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. **Protein Science**, v. 19, n. 6, p. 1137-1161, jun. 2010.

LAZARUS, R. C. et al. Protein carbonylation after traumatic brain injury: cell specificity, regional susceptibility, and gender differences. **Free Radical Biology Medicine**, v. 78, p. 89-100, jan. 2015.

LEE, D.-H.; GOLD, R.; LINKER, R. A. Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11783-11803, set. 2012.

LEMOS, L. L. P. et al. The Assessment for Disinvestment of Intramuscular Interferon Beta for Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis in Brazil. **PharmacoEconomics**, nov. 2017.

LEMUS, H. N.; WARRINGTON, A. E.; RODRIGUEZ, M. Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. **Neurologic Clinics**, v. 36, n. 1, p. 1-11, fev. 2018.

LERAY, E. et al., Epidemiology of multiple sclerosis. **Revue Neurologique (Paris),** v. 172, n. 1, p. 3-13, jan. 2016.

Li, Y. et al. Cholinesterase inhibitors for rarer dementias associated with neurological conditions. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 3, n. 3, p. 1-55, mar. 2015.

LJUBISAVLJEVIC, S. et al. Cerebrospinal fluid and plasma oxidative stress biomarkers in different clinical phenotypes of neuroinflammatory acute attacks. Conceptual accession: from fundamental to clinic. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 33, n. 6, p. 767-777, ago. 2013.

_____. Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. **Journal of Neurological Sciences,** v. 337, n. (1-2), p. 8-13, fev. 2014.

_____. The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced protein oxidation products and total thiol content in plasma and CSF. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 7, p. 988-997, jun. 2013.

LOUVEAU, A.; HARRIS, T.H.; KIPNIS, J. Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 10, p. 569-577, out. 2015.

LUBLIN, F. D. et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. **Neurology**, v. 83, n. 3, 278-286, jul. 2014.

LUTTIKHUIZEN, D. T. et al. Expression of P2 receptors at sites of chronic inflammation. **Cell Tissue Research**, v. 317, n. 3, p. 289-298, set. 2004.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-692, abr. 2011.

MAGYARI, M. Gender differences in multiple sclerosis epidemiology and treatment response. **Danish Medical Journal**, v. 63, n. 3, mar. 2016.

MAHAD, D. H.; TRAPP, B. D.; LASSMANN, H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 2, p. 183-193, fev. 2014.

MAIUOLO, J. et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion. **International Journal Cardiology**, v. 213, p. 8-14, jun. 2016.

MALONI, H. W. Multiple sclerosis: managing patients in primary care. **The Nurse Practitioner**, v. 38, n. 4, p. 24-35, abr. 2013.

MAO, P.; REDDY, P. H. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1802, n. 1, p. 66-79, jan. 2010.

MARRIE, R. A. et al. Sex differences in comorbidity at diagnosis of multiple sclerosis: A population-based study. **Neurology**, v. 86, p. 1279-1286, mar. 2016.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577-586, out. 2005.

MATERA, C.; TATA, A. M. Pharmacological approaches to targeting muscarinic acetylcholine receptors. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 85-100, 2014.

MATTIOLI, F. et al. Persistence of the effects of attention and executive functions intensive rehabilitation in relapsing remitting multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 1, n. 4, p. 168-173, out. 2012.

MAY, J. M. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. **Sub-Cellular Biochemitry**, v. 56, p. 85-103, 2012.

MAZZANTI, C. M. et al. Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. **Neurochemical Research,** v. 31, n. 8, p. 1027-1034, ago. 2006.

_____. Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. **International Journal of Development Neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 259-264, jun. 2007.

_____. Pre-treatmant with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. **International Journal of Development Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 73-80, fev. 2009.

McBEAN, G. J. et al. Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease. **Redox Biology**, v. 5, p. 186-194, ago, 2015.

MILLER, D. H. et al. Pregnancy, sex and hormonal factors in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 20, n. 5, p. 527-536, abr. 2014.

MILLER, E. et al. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. (1-2), p. 26-30, jan. 2012.

MILLER, E. Multiple sclerosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 724, p. 222-238, 2012.

MILLER, E.; WACHOWICZ, B.; MAJSTEREK, I. Advances in antioxidative therapy of multiple sclerosis. **Current Medicinal Cheministry**, v. 20, n. 37, p. 4720-4730, 2013.

MILLET, T. et al. Role of the α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and RIC-3 in the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway. **Central Nervous System Agents in Medical Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 90-99, 2017.

MILO, R.; KAHANA, E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. (A387-394), mar. 2010.

MILO, R.; MILLER, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. (4-5), p. 518-524, abr./mai. 2014.

MILO, R.; PANITCH, H. Combination therapy in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 231, n. (1-2), p. 23-31, fev. 2011.

MILO, R.; MILLER, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. (4-5), p. 518-524, abr-mai. 2014.

MIR, F. et al. CSF isoprostane levels are a biomarker of oxidative stress in multiple sclerosis. **Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 1, n. 2, ago. 2014.

MIRSHAFIEY, A.; MOHSENZADEGAN, M. Antioxidant therapy in multiple sclerosis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 31, n. 1, p. 13-29, fev. 2009.

MIZUMOTO, N. et al. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. **Nature Medicine**, v. 8, n. 4, p. 358-365, abr. 2002.

MORA, J. R.; IWATA, M.; von ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 685-698, set. 2008.

MOREIRA, M. A. et al. Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. **Revista de Neurologia**, v. 34, n. 4, p. 379-83, fev. 2002.

MORETTI, M.; FRAGA, D. B.; RODRIGUES, A. L. S. Preventive and therapeutic potential of ascorbic acid in neurodegenerative diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 23, n. 12, p. 921-929, dez. 2017.

MULS, N. G. et al. Regulation of Treg-associated CD39 in multiple sclerosis and effects of corticotherapy during relapse. **Multiple Sclerosis**, v. 21, n. 12, p. 1533-1545, out. 2015.

MURRAY, T. J. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. **Journal of Neurological Sciences**, v. 277, n. (Suppl 1), p. (S3-8), fev. 2009.

NATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS SOCIETY. Disponível em: <https://www.nationalmssociety.org/What-is-MS/Types-of-MS>. Acesso em: 03 nov. 2017.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **British Journal of Pharmacology**. v. 153, n. 1, p. 6-20, jan. 2008.

NEUHAUS, O.; ARCHELOS, J.; HARTUNG, H. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunossupression to neuroprotection. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 3, p. 131-138, mar. 2003.

NIZRI, E. et al. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 540-547, abr. 2006.

NIZRI, E.; BRENNER, T. Modulation of inflammatory pathways by the immune cholinergic system. **Amino Acids**, v. 45, n. 1, p. 73-85, jul. 2013.

OHL, K.; TENBROCK, K.; KIPP, M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. **Experimental Neurology**, v. 277, p. 58-67, mar. 2016.

OLIVEIRA, P. et al. Cell-specific regulation of acetylcholinesterase expression under inflammatory conditions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 51, n. 2, p. 129-137, jan. 2012.

OLIVEIRA, S. R. et al. Vitamin D deficiency is associated with disability and disease progression in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress. **Journal of Neurological Sciences**, v. 381, p. 213-219, out. 2017.

OLSEN, J. A.; AKIRAV, E. M. Remyelination in multiple sclerosis: cellular mechanisms and novel therapeutic approaches. **Journal of Neuroscience Research**, v. 93, n. 5, p. 687-696, mai. 2015.

OLSSON, T.; BARCELLOS, L. F.; ALFREDSSON, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**. v. 13, n. 1, p. 25-36, jan. 2017.

ONTANEDA, D. et al. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. **Lancet**, v. 389, n. 10076, p. 1357-1366, abr. 2017.

ORTIZ, G. G. et al. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. **Clinical & Development Immunology**, v. 2013, p. 1-14, jul. 2013.

OYANGUREN-DESEZ, O. et al. Gain-of-function of P2X7 receptor gene variants in multiple sclerosis. **Cell Calcium**, v. 50, n. 5, p. 468-472, nov. 2011.

PANKRATZ, S. et al. The Inflammatory Role of Platelets: Translational Insights from Experimental Studies of Autoimmune Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, out. 2016.

PATTI, F. et al. Quality of life, depression and fatigue in mildly disabled patients with relapsing- remitting multiple sclerosis receiving subcutaneous interferon beta-1a: 3-year results from the COGIMUS (COGnitive Impairment in MULtiple Sclerosis) study. **Multiple Sclerosis**, v. 17, n. 8, p. 991-1001, ago. 2011.

PAUL, S. et al. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, n. 43, p. 1-11, abr. 2015.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116-129, out. 2012.

PIERROT-DESEILLIGNY, C.; SOUBERBIELLE, J. C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 14, p. 35-45, mai. 2017.

PLEMEL, J. R. Three new avenues to treat progressive Multiple Sclerosis: remyelination, neuroprotection, and targeting astrocytes, **ResearchGate**, jan. 2018. Disponível em: < https://www.researchgate.net/blog/post/three-new-avenues-to-treat-progressive-multiple-sclerosis-remyelination-neuroprotection-and-targeting-astrocytes>. Acesso em: 21 jan. 2018.

POHANKA, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker**. Bratislavske Lekrske Listy**, v. 114, n. 12, p. 726-734, 2013.

POLACHINI, C. R. et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. **Neuroscience**, v. 266, p. 266-274, abr. 2014.

_____. Evaluation of Delta-Aminolevulinic Dehydratase Activity, Oxidative Stress Biomarkers, and Vitamin D Levels in Patients with Multiple Sclerosis. **Neurotoxicity Research**, v. 29, n. 2, p. 230-242, fev. 2016.

POLMAN, C. H. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 2, p. 292-302, fev. 2011.

PORCEL, J.; MONTALBAN, X. Anticholinesterasics in the treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 245, n. (1-2), p. 177-181, jun. 2006.

PRADO, V. F. et al. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. **The Biochemical Journal**, v. 450; n. 2; p. 265-274; mar. 2013.

PRINZ, M.; PRILLER, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 136-144, fev. 2017.

PRZYBEK, J. et al. Evolution of diagnostic criteria for multiple sclerosis. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, v. 49, n. 5, p. 313-321, 2015.

PUCHAŁOWICZ, K. et al. P2X and P2Y receptors-role in the pathophysiology of the nervous system. **International Journal of Molecular Science**, v. 15, n. 12, p. 23672-23704, dez. 2014.

QUÍLEZ, M. R. B. et al. Esclerosis múltiple. Factores etiológicos, modelos experimentales, mecanismos patogénicos e inmunopatología. **Medicine**, v. 10, n. 75, p. 5069-5078, 2011.

QUINTANA, F. J. et al. Lipids and lipid reactive antibodies as biomarkers for multiple sclerosis. **Journal Neuroimmunology**, v. 248, n. (1-2), p. 53-57, jul. 2012.

RAJDA, C. et al. Excitotoxins, Mitochondrial and Redox Disturbances in Multiple Sclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1-28, fev. 2017.

RAJENDRAN, P. et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332-347, set. 2014.

RANSOHOFF, R. M.; ENGELHARDT, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 9, p. 623-635, set. 2012.

RANSOHOFF, R. M.; HAFLER, D. A.; LUCCHINETTI, C. F. Multiple sclerosis-a quiet revolution. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 3, p. 134-142, mar. 2015.

RAPHAEL, I. et al. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis: how far we have come and how they could affect the clinic now and in the future. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 11, n. 1, p. 69-91, jan. 2015.

REALE, M. et al. Relation between pro-inflammatory cytokines and acetylcholine levels in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 10, p. 12656-12664, out. 2012.

REARDON, C. Neuro-immune interactions in the cholinergic anti-inflammatory reflex. **Immunology Letters**, v. 178, p. 92-96, out. 2016.

REID, G. A.; CHILUKURI, N.; DARVESH, S. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. **Neuroscience**, v. 234, p. 53-68, mar. 2013.

REINHARDT, K. et al. Multiple sclerosis in children and adolescents: incidence and clinical picture-new insights from the nationwide German surveillance (2009–2011). **European Journal of Neurology**, v. 21, n. 4, p. 654-659, abr. 2014.

REIPERT, B. Multiple sclerosis: a short review of the disease and its differences between men and woman. **The Journal of Men's Health & Gender**, v. 1, n. 4, p. 334-340, dez. 2004.

RICCIARELLI, R. et al. Vitamin E and neurodegenerative diseases. Molecular Aspects of Medicine, v. 28, n. (5-6), p.591-606, out/dez. 2007.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, jun. 2006.

ROCHA, J. B. T. et al. Aminolevulinate dehydratase (δ-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicology Research**, v. 1, n. 2, p. 85-102, jul. 2012.

RØSJØ, E. et al. Increasing serum levels of vitamin A, D and E are associated with alterations of different inflammation markers in patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 271, n. (1-2), p. 60-65, jun. 2014.

RUET, A. et al. Cognitive impairment differs between primary progressive and relapsing-remitting MS. **Neurology**, v. 80, n. 16, p. 1501-1508, abr. 2013.

RUNIA, T. F.; VAN PELT-GRAVESTEIJN, E. D.; HINTZEN, R. Q. Recent gains in clinical multiple sclerosis research. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 11, n. 5, p. 497-505, ago. 2012.

RUTKOWSKI, R. et al. [Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process]. **Polski Merkuriusz Lekarski**, v. 23, n. 134, p. 131-136, ago. 2007.

SABATINO, J. J. Jr.; ZAMVIL, S. S; HAUSER, S. L. B-Cell Therapies in Multiple Sclerosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. [DOI: 10.1101/cshperspect.a032037], jan. 2018.

SAFARZADEH, E. et al. The role of adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Inflammation Research**, v. 65, n. 7, p. 511-520, jul. 2016.

SALEMI, G. et al. Blood lipids, homocysteine, stress factors, and vitamins in clinically stable multiple sclerosis patients. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 19, p. 1-3, fev. 2010.

SANTARPIA, L. et al. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 1, p. 31-39, mar. 2013.

SASSA, S. ALA-D porphyria. **Seminars in Liver Disease**, v. 18, n. 1, p. 95-101, 1998.

SAUER, E. et al. Liver δ-aminolevulinate dehydratase activity is inhibited by neonicotinoids and restored by antioxidant agents. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 11, p. 11676-11690, nov. 2014

SCHETINGER, M. R. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors** v. 31, n. 2, p. 77-98, mar. 2007.

SCOTT, T. F.; LAFORET, G.; YOU, X. Aggressive relapsing multiple sclerosis characterized by rapid disability progression. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 2, n. 4, p. 370-376, out. 2013.

SEIXAS, D. et al. Pain in portuguese patients with multiple sclerosis. **Frontiers in Neurology**, v. 2, n. 20, mar. 2011.

SÉNECAL, V. et al. Production of IL-27 in Multiple Sclerosis Lesions by Astrocytes and Myeloid Cells Modulation of Local Immune Responses. **GLIA**, v. 64, n. 4, p. 553-569, abr. 2016.

SÉVIGNY, J.; MARTÍN-SATUÉ, M.; PINTOR, J. Purinergic Signalling in Immune System Regulation in Health and Disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-3, mar. 2015.

SHARMA, R. et al. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 120, n. 2, p. 223-236, ago. 2010.

SHEN, Z. X. Rationale for diagnosing deficiency of ChEs and for applying exogenous HuChEs to the treatment of diseases. **Medical Hypotheses**, v. 70, n. 1, p. 43-51, 2008.

SHOEMAKER, T. J.; MOWRY, E. M. A review of vitamin D supplementation as disease-modifying therapy. **Multiple Sclerosis**, v. 24, n. 1, p. 6-11, jan. 2018.

SKOK, M. V. et al. The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation. **Life Sciences**, v. 80, n. (24-25), p. 2334-2336, mai. 2007.

SPANEVELLO, R. M. et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 1, p. 24-30, jan. 2010a.

_____. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. (3-4), p. 210-214, fev. 2010b.

STOCKWELL, J.; JAKOVA, E.; CAYABYAB, F. S. Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. **Molecules**, v. 22, n. 4, abr. 2017.

STONE, T. W.; CERUTI, S.; ABBRACCHIO, M. P. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 193, p. 535-587, mai. 2009.

TATA, A. M. Cholinergic system dysfunction and neurodegenerative diseases: cause or effect?. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 13, n. 7, p. 1294-1303, 2014.

TAVAZZI, B. et al. Serum metabolic profile in multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis International**, v. 2011, p. 1-8, mai. 2011.

TEUNISSEN, C. E. et al., Body fluid biomarkers for multiple sclerosis--the long road to clinical application. **Nature Reviews. Neurology**, v. 11, n. 10, p. 585-596, out. 2015.

THORMANN, J.; STEINBERG, H. Friedrich Theodor von Frerichs (1819-1885). **Journal of Neurology**, v. 261, n. 1, p. 248-249, jan. 2014.

TILBERY, C. P. et al. Efeitos adversos no tratamento da Esclerose Múltipla com drogas imunomoduladoras - experiência em 118 casos. **Revista Neurociências**, v. 17, n. 3, p. 220-225, ago. 2009.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. (3-4), p. 145-155, mai./jun. 2003.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 2, p. 289-296, fev. 2007.

TRINCAVELLI, M. L.; DANIELE, S.; MARTINI, C. Adenosine receptors: what we know and what we are learning. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 9, p. 860-877, 2010.

TROJANO, M. et al. Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. **PLoS one**, v. 7, n. 10, 2012.

VALENTINI, J. et al. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 6, p. 378-382, jul./ago. 2008.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, ago. 2007.

van HORSSEN, J. et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, n. 12, p. 1729-1737, dez. 2008.

van HORSSEN, J. et al. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, n. 2, p. 141-150, fev. 2011.

VANLANGENAKKER, N. et al. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 207-220, mai. 2008.

VASCONCELOS, C. C. et al. Multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 151, p. 24-30, dez. 2016.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, jul. 2007.

VILLACORTA, L.; AZZI, A.; ZINGG, J. M. Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, n. 5-6, p. 507-537, out./dez. 2007.

WACHOWICZ, B. et al. The physiology of blood platelets and changes of their biological activities in multiple sclerosis. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 76, n. 4, p. 269-281, 2016.

WANG, C. et al. Lower 25-Hydroxyvitamin D Is Associated with Higher Relapse Risk in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, v. 22, n. 1, p. 38-43, 2018.

WANG, D. W.; ZHOU, R. B.; YAO, Y. M. Role of cholinergic anti-inflammatory pathway in regulating host response and its interventional strategy for inflammatory diseases. **Chinese Journal of Traumatology**, v. 12, n. 6, p. 355-364, dez. 2009.

WANG, P. et al. Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. **European Neurology**, v. 72, n. 3-4, p. 249-254, 2014.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 8, p. 1558-1571, ago. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008**. 2008, Geneva: WHO Press. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43968/1/9789241563758_eng.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2017.

XIE, L.; YANG, S. H. Interaction of astrocytes and T cells in physiological and pathological conditions. **Brain Research**, v. 1623, p. 63-73, out. 2015.

XIN, Y. et al. Review: Effect study of sex hormone in the multiple sclerosis of common neurological disorders. **Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. (4 Suppl), p. 1563-1566, jul. 2015.

YADAV, S. K. et al. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 28, n. 3, p. 206-219, jun. 2015.

YAMASAKI, R. et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1533-1549, jul. 2014.

YANG, L.; TAN, D.; PIAO, H. Myelin Basic Protein Citrullination in Multiple Sclerosis: A Potential Therapeutic Target for the Pathology. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 8, p. 1845-1856, ago. 2016.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 6, p. 473-497, nov./dez. 2014.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, mai. 2008.

ZAHOOR, I.; HAQ, E. Vitamin D and Multiple Sclerosis: An Update. **Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis [Internet]**. Brisbane (AU): Codon Publications; Chapter 5, nov. 2017.

ZAVIALOV, A. V. et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 2, p. 279-290, ago. 2010.

ZIVKOVIC, A. R. et al. Reduced serum butyrylcholinesterase activity indicates severe systemic inflammation in critically ill patients. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-11, jan. 2015.

_____. Reduced serum cholinesterase activity indicates splenic modulation of the sterile inflammation. **The Journal of Surgical Research**, v. 220, p. 275-283, dez. 2017.

ANEXO

ANEXO A – PARECER DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA, DENSIDADE DE RECEPTORES COLINÉRGICOS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Pesquisador: Vera Maria Melchiors Morsch

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 26757114.4.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 555.308

Data da Relatoria: 11/03/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo de caráter exploratório e abordagem quantitativa que visa descrever os mecanismos envolvidos na patogênese da esclerose múltipla (EM), assim como, identificar possíveis marcadores bioquímicos para esta doença de caráter autoimune e inflamatória em pacientes com a patologia citada.Esta doença representa a causa mais comum de incapacidade neurológica crônica não traumática em adultos jovens, e por muitas vezes, ocasiona déficits motores (fraqueza, fadiga e falta de equilíbrio), sensitivos (hipoestesias ou anestesias) e alterações visuais.

Na EM ocorre uma alteração no sistema imune sendo que os linfócitos são as principais células envolvidas no processo de desmielinização. Dentre os mediadores capazes de modular as ações dos linfócitos destaca -se a acetilcolina (ACh), que é capaz de sensibilizar seus receptores colinérgicos do tipo muscarínico e nicotínico induzindo a uma cascata de alterações que podem modular a resposta imune, bem como, as concentrações dessa molécula podem ser mantidas constantes no meio extracelular pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE). Além disso, um desequilíbrio entre a produção e a degradação de espécies reativas (ERs) pode levar a geração de estresse oxidativo. Em especial, as espécies reativas de oxigênio (EROs) têm sido consideradas mediadoras de desmielinização e dano axonal

nessa doença, porém muitos dos mecanismos ainda são pouco compreendidos. Neste contexto,

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

torna-se relevante a avaliação da densidade de receptores colinérgicos, o estudo das enzimas colinesterases envolvidas na regulação do sistema imune, bem como, dos biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com EM. Para o presente estudo serão avaliados dois grupos: Grupo Controle composto por voluntários saudáveis e Grupo
EM, composto por pacientes diagnosticados com a forma surto-remissão da EM.Os voluntários
saudáveis serão oriundos da cidade de Santa Maria e os pacientes com EM serão provenientes de um grupo de apoio desta mesma cidade, sob supervisão e autorização do médico neurologista responsável, bem como, os pacientes vinculados ao Serviço de Fisioterapia do Hospital Universitário de Santa Maria, da Universidade Federal de Santa Maria. Após um levantamento dos sujeitos que participam de um grupo de apoio aos portadores de EM e dos pacientes com essa doença atendidos no Serviço de Fisioterapia do HUSM, que poderiam participar do estudo por corresponderem aos critérios de inclusão e exclusão, entrar-se-á em contato com eles e os mesmos serão convidados a participar voluntariamente do projeto.
Estima-se que no máximo 40 portadores oriundos da cidade de Santa Maria, estejam participando ativamente da associação. É importante salientar que alguns destes pacientes, também, são atendidos pelo Serviço do HUSM. Baseado nestas informações, espera-se obter no mínimo 35 sujeitos que queiram participar deste estudo.Por conseguinte, para realização do presente este estudo serão avaliados dois grupos: O grupo controle: composto por voluntários saudáveis, com sexo e idade igual ou semelhante ao grupo com a doença e que não apresentarem nenhuma patologia neurológica e autoimune ou outras comorbidades como diabetes, hipertensão (n=35). O grupo surto-remissão da EM: composto por pacientes já diagnosticados com EM que apresentam surtos seguidos pelo desaparecimento dos sintomas (remissão) (n=35).
Amostras de sangue serão coletadas destes indivíduos, através de punção venosa e utilizadas para a separação de linfócitos, obtenção de sangue e soro para as posteriores análises enzimáticas e de estresse oxidativo, através de métodos detalhadamente descritos no projeto, em laboratórios equipados para a realização dos testes.
Os resultados obtidos serão submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando um teste post-hoc adequado ao nível mínimo de 95% de significância ($P<0.05$).

Objetivo da Pesquisa:
GERAL: Investigar os mecanismos moleculares envolvidos nos processos pró-inflamatórios induzidos pela modulação de receptores e atividade de enzimas do sistema colinérgico, bem como avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com EM na forma surto-remissão e realizar uma comparação com indivíduos saudáveis.

ESPECÍFICOS:
Em pacientes com a forma surto-remissão da EM e em indivíduos saudáveis:
- Detectar possíveis alterações na densidade de receptores muscarínicos e nicotínicos em linfócitos;
- Verificar a atividade e densidade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em sangue total e linfócitos;
- Verificar a densidade da enzima colina acetiltransferase (ChAT) em sangue total e linfócitos;
- Quantificar os níveis de vitamina D em soro;
- Avaliar a atividade da enzima ácido delta-aminolevulínico desidratase (¿ ALA-D) em sangue total;
- Avaliar o estado das defesas antioxidantes não enzimáticas através da determinação dos níveis de vitamina C e vitamina E no soro destes pacientes;
- Verificar a atividade das enzimas do sistema antioxidante, através da determinação da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) em sangue;
- Determinar tióis totais (T-SH) e tióis não-proteicos (NPSH);
- Analisar os efeitos danosos do estresse oxidativo através da determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS), oxidação de proteínas (carbonil), e danos ao DNA (ensaio cometa alcalino);
- Verificar o efeito in vitro dos fármacos utilizados pelos portadores de EM sobre a atividade das colinesterases;
- Analisar e correlacionar dados relevantes para o estudo como: sexo, idade, ocupação, uso de métodos contraceptivos (influência hormonal), medicação em uso, dentre outras informações; através de um questionário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
RISCOS: O desconforto do paciente se resume à picada da agulha, sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxeado, voltando ao normal em poucos dias, não requerendo nenhum cuidado especial, e cansaço ao responder o questionário.

BENEFÍCIOS:indiretos através de conhecimento para a comunidade acadêmica, científica, assim como para população em geral sobre novas perspectivas de tratamento para a EM.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Projeto bem delineado, com objetivos, justificativa e metodologia coerentes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta termo de confidencialidade, TCLE, folha de rosto, autorização institucional, registro no GAP, devidamente redigidos e assinados.

Recomendações:

.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 13 de Março de 2014

Assinador por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com