

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS COLINESTERASES,
ADENOSINA DESAMINASE E BIOMARCADORES DE
INFLAMAÇÃO EM PACIENTES COM
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Roberta Nunes Polachini

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS COLINESTERASES,
ADENOSINA DESAMINASE E BIOMARCADORES DE
INFLAMAÇÃO EM PACIENTES COM
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Carla Roberta Nunes Polachini

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Prof. Dr.^a Vera Maria Melchiors Morsch
Co-orientadora: Prof. Dr.^a Roselia Maria Spanevello

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Nunes Polachini, Carla Roberta
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS COLINESTERASES, ADENOSINA
DESAMINASE E BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO EM PACIENTES
COM ESCLEROSE MÚLTIPLA / Carla Roberta Nunes Polachini.-
2013.
88 p.; 30cm

Orientador: Vera Maria Melchiors Morsch
Coorientador: Roselia Maria Spanevello
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2013

1. Esclerose múltipla 2. Colinesterases 3. Adenosina
desaminase 4. Inflamação 5. Citocinas I. Melchiors
Morsch, Vera Maria II. Spanevello, Roselia Maria III.
Título.

© 2013

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: carlinha_polachini@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS COLINESTERASES, ADENOSINA
DESAMINASE E BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO EM
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

elaborada por
Carla Roberta Nunes Polachini

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Vera Maria Melchiors Morsch, Dr^a (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)

Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti, Dr^a (UFSM)

Nilda Berenice de Vargas Barbosa, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 19 de agosto de 2013.

Dedico esta dissertação àquelas pessoas que ao longo da vida me educaram e incentivaram como pessoa e fisioterapeuta: a minha família, que dá sentido a minha vida, principalmente, a minha mãe, exemplo de mulher, que, com muita simplicidade, carinho e amor, sempre me ensinou tudo aquilo que realmente importa na vida. Ao meu namorado, pelos momentos de felicidade, compreensão, e pelo incentivo constante. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado, vocês dão sentido a minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir desfrutar de saúde e paz para a realização de mais um sonho e por nunca ter me abandonado, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por iluminar sempre meu caminho dando-me forças para lutar por meus objetivos.

À minha família, por todos os ensinamentos, compreensão, carinho e incentivo. Agradeço em especial à minha mãe, Maria Elizete que sempre apoia minhas boas e “nem tão boas” ideias, dando-me segurança e confiança de que tudo tem a hora certa para acontecer. Obrigada, por nunca, em nenhum segundo, deixar de incentivar os meus estudos e pela confiança de me deixar trilhar o meu caminho, mesmo com o coração apertado pela distância que nos separa, estando sempre presente em minha vida, me protegendo e orientando. Mãe, te amo, serei eternamente grata!

À minha “segunda família”, Luís Antônio e Marta, os pais que além de me darem um dos melhores presentes que recebi nesta vida: o meu namorado, cuidam de mim como jamais imaginei ser merecedora. Muito obrigada por tudo!

Ao meu namorado Antônio, meu amor, meu cúmplice nos momentos certos e incertos da vida! Agradeço, por me dar incentivo para lutar sempre pelas minhas metas, por aguentar ao meu lado me dando forças nos dias em que tive vontade desistir de tudo. Exemplo de caráter, determinação e companheirismo. Obrigada por zelar sempre por nós.

À minha orientadora, prof. Vera Maria Morsch, meus sinceros agradecimentos, por ter acreditado em mim, me orientando no desenvolvimento deste trabalho, bem como, pelo apoio e incentivo em todos os momentos de angústia. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, carinho e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Agradeço à Rose querida, co-orientadora com que a vida me presenteou pessoa admirável, exemplo de profissional. Agradeço pela paciência nos meus momentos de ansiedade, pela disponibilidade de me ensinar, sempre com doçura e empolgação, me fazendo amar cada vez mais o meu trabalho. Obrigada por todas as sugestões durante a elaboração deste trabalho e incentivo constante.

Agradeço enormemente à professora Dr^a. Maria Rosa Schetinger, que confiou em mim, desde o primeiro momento que cheguei a sua sala ainda meio perdida na bioquímica, mas com a certeza de que queria trabalhar na pesquisa. Obrigada pela disponibilidade em auxiliar e pelos ensinamentos.

As professoras Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti e Nilda Berenice de Vargas Barbosa por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À Danizinha, minha querida amiga, agradecer é muito pouco pelos vários momentos em que teve a paciência de sanar as minhas dúvidas. Sempre com seu jeitinho calmo e meigo me deixava mais tranquila para enfrentar as adversidades que apareciam. Tenho certeza que, independente das escolhas que façás em tua vida, terás muito sucesso no que depender da tua dedicação e capacidade.

À Lú e a Juci, obrigada pelo companheirismo, carinho e amizade, por tentarem me deixar menos aflita nos momentos em que ansiedade superava a calma. Adoro vocês! Também gostaria de agradecer ao Gustavo, pelos ensinamentos e confiança logo que iniciei no laboratório.

A todos os amigos e colegas do laboratório 2208, pelo apoio, ajuda e contribuição para realização deste trabalho.

À professora, fisioterapeuta e amiga Ana Lúcia Cervi Prado, exemplo de pessoa e profissional. Obrigada pelos ensinamentos na Fisioterapia, e por sempre alimentar de energia os meus planos de seguir a carreira acadêmica, por me fazer acreditar no meu potencial!

Ao médico neurologista Juarez Lopez, pela atenção e pelo apoio para realização deste trabalho.

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

À UFSM e ao curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade.

À CAPES, pela bolsa concedida.

A todos os que, de forma incansável, me apoiaram de diferentes modos, contribuindo e dando-me alento para concretização deste trabalho, gostaria de agradecer.

*E a vida segue, a gente chora, sorri,...
A gente acerta, falha. Corre contra o tempo e
se atrapalha. Não desisti de seguir, de sonhar...
Por mais que haja obstáculos...
Vale a pena acreditar.
(Sirlei L. Passdongo)*

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

Albert Einstein

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS COLINESTERASES, ADENOSINA DESAMINASE E BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Autora: Carla Roberta Nunes Polachini
Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch
Co-orientadora: Roselia Maria Spanevello
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de agosto de 2013.

A Esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune complexa, pois vários processos fisiopatológicos, incluindo inflamação, desmielinização, lesão axonal e mecanismos de reparo estão envolvidos em seu aparecimento. Atinge o sistema nervoso central (SNC), podendo afetar tanto o encéfalo quanto a medula. Pesquisas têm demonstrado que alterações na resposta imune e a presença dos eventos pró-inflamatórios, poderiam levar ao surgimento da patologia e dos surtos na EM. Nesse contexto, torna-se importante o estudo das enzimas colinesterases, tais como: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), bem como dos biomarcadores inflamatórios e nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e da enzima adenosina desaminase (ADA) na EM, pois todos estes parâmetros estão envolvidos na regulação do sistema imune e nos processos pró e/ou anti-inflamatórios. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a atividade da AChE em linfócitos e sangue total bem como a atividade das enzimas BChE e ADA e os níveis da IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e proteína C-reativa (CRP) em soro. Adicionalmente, foram avaliados também os níveis de ATP, ADP, AMP, adenosina, inosina, hipoxantina e ácido úrico em indivíduos saudáveis e no soro de pacientes com a forma remittente-recorrente da EM (RREM). Os resultados obtidos demonstraram um aumento na atividade da AChE em linfócitos assim como em sangue total e da BChE em soro de pacientes quando comparados com indivíduos saudáveis ($P < 0.05$). Também, foi observado em soro, um aumento nos níveis da IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α e proteína C-reativa e uma diminuição na IL-10, em pacientes com RREM quando comparados com o grupo controle. Outra constatação importante foi o aumento da atividade da ADA em soro nos pacientes com RREM, em comparação com o grupo controle. Além disso, os resultados das análises dos nucleotídeos em soro demonstraram que os níveis de ADP, AMP, adenosina foram aumentados em portadores de RREM, enquanto que os níveis de ATP foram diminuídos nesse grupo. Os resultados descritos aqui sugerem que a atividade das colinesterases, e os biomarcadores inflamatórios e purinérgicos estão alterados em pacientes com RREM, sugerindo assim uma resposta inflamatória exacerbada. Esses achados poderão ser úteis para ampliar a janela terapêutica para o tratamento e monitoramento desta doença.

Palavras-chave: Esclerose múltipla. Colinesterases. Adenosina desaminase. Inflamação. Citocinas. Nucleotídeos.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EVALUATION OF CHOLINESTERASE AND ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITIES AND INFLAMMATION BIOMARKERS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Author: Carla Roberta Nunes Polachini

Advisor: Vera Maria Melchiors Morsch

Co-advisor: Roselia Maria Spanevello

Place and Date of the Defense: Santa Maria, August 19th, 2013.

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease complex, since several pathophysiological processes, including inflammation, demyelination, axonal damage and repair mechanisms are involved in its emergence. It attacks the central nervous system (CNS) and may affect both brain and bones. Researches have shown that changes in the immune response and the presence of pro-inflammatory events may lead to the emergence of pathologies and relapses in the MS. In this context, it becomes important to study cholinesterase enzymes such as acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) as well as the inflammatory biomarkers and nucleotides and nucleosides of adenine and adenosine deaminase (ADA) because all these parameters are involved in regulating the immune system and pro- and/or anti-inflammatory processes. Thus, the objective of this study was to verify the AChE activity in lymphocytes and whole blood as well as the activity of BChE and ADA enzymes and the levels of IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α and C-reactive protein (CRP) in serum. Additionally, we evaluated the levels of ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, hypoxanthine, and uric acid in healthy subjects and in the serum of patients with the relapsing-remitting form of MS (RRMS). Results showed a significant increase in the AChE activity in lymphocytes as well as whole blood and serum BChE in patients compared with healthy subjects ($P < 0.05$). Also, we observed an increase in serum levels of IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α and C-reactive protein (CRP) and a decrease in IL-10 in patients with RRMS when compared to the control group. Another important finding was the increased ADA activity in serum in patients with RRMS compared to the control group. Furthermore, results of the nucleotide analysis in serum showed that the levels of ADP, AMP and adenosine were increased in carries of RRMS, whereas ATP levels were decreased in this group. The results described here suggest that the cholinesterase activity, biomarkers and purinergic inflammatory are altered in patients with RRMS, suggesting thus an exacerbated inflammatory response. These findings may be useful to extend the therapeutic window for the treatment and monitoring of this disease.

Keywords: Multiple Sclerosis. Cholinesterases. Adenosine deaminase. Inflammation. Cytokines. Nucleotides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

- Figura 1 – Representação da bainha de mielina normal e após o processo de desmielinização (Adaptado de MALONI, 2013)..... 16
- Figura 2 – Formas de esclerose múltipla (Adaptado de MALONI, 2013)20
- Figura 3 – Diferenciação funcional de células T (Adaptado de COMABELLA; KHOURY, 2012)24
- Figura 4 – Mecanismos envolvidos na patogênese da EM. (1) ativação periférica; (2) migração de linfócitos ativados através da BHE; (3) reativação de linfócitos T no SNC e secreção de mediadores pró-inflamatórios; (4) indução da desmielinização; (5) dano axonal (adaptado de CORREALE et al., 2012).....25
- Figura 5 – Esquema da sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (vAChT) (Adaptado de SOREQ; SEIDMAN, 2001)28
- Figura 6 – Cascata de ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (Adaptado de YEGUTKIN, 2008).....34

Manuscrito

- Figure 1 – Atividade da AChE em linfócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com EM. As barras representam média±erro padrão. *Representa a diferença estatística do grupo controle (Teste t de Student, * $P < 0.05$ n =29)64
- Figure 2 – Atividade da AChE em sangue total de indivíduos saudáveis e pacientes com EM. As barras representam média±erro padrão. *Representa a diferença estatística do grupo controle (Teste t de Student, * $P < 0.05$ n =29)64
- Figure 3 – Atividade da BChE em soro de indivíduos saudáveis e pacientes com EM. As barras representam média±erro padrão. *Representa a diferença estatística do grupo controle (Teste t de Student, * $P < 0.05$ n =29)65
- Figure 4 – Atividade da ADA em soro de indivíduos saudáveis e pacientes com EM. As barras representam média±erro padrão. ***Representa a diferença estatística do grupo controle (Teste t de Student, *** $P < 0.0001$ n =21)65

- Figure 5 – Níveis de citocinas em soro de indivíduos saudáveis e pacientes com EM. As barras representam média±erro padrão. *Indica a diferença estatística do grupo controle (Teste t de Student, $*P<0.05$ n =29) e ***representa a diferença estatística do grupo controle (Teste t de Student, $***P<0.0001$ n =29)66
- Figure 6 – Níveis da proteína C- reativa (CRP) em soro de indivíduos saudáveis e pacientes com EM. As barras representam média±erro padrão. *Indica a diferença estatística do grupo controle (Teste t de Student, $*P<0.05$ n =29)67

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

- Table 1 – Características gerais dos pacientes com EM e indivíduos saudáveis.....68
- Table 2 – Níveis de purinas em soro de indivíduos saudáveis e pacientes com EM analisados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os resultados estão expressos em nmol/ml de soro (n= 8-10). Os dados estão representados como média±erro padrão. (ATP=adenosina trifosfato, ADP=adenosina difosfato, AMP=adenosina monofosfato, Ado=adenosina, Ino=inosina, Hipo=hipoxantina e ácido úrico). *Representa a diferença estatística do grupo controle (Teste t de Student, * $P < 0.05$) 68

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	– Acetilcolina
AChE	– Acetilcolinesterase
ADA	– Adenosina desaminase
ADP	– Adenosina difosfato
AMP	– Adenosina monofosfato
ATP	– Adenosina trifosfato
BChE	– Butirilcolinesterase
BHE	– Barreira hematoencefálica
ChAT	– Colina-aciltransferase
ChT	– Transportador de colina
CRP	– Proteína C-reativa
EM	– Esclerose múltipla
IACHes	– inibidores da acetilcolinesterase
IFNs	– Interferons
IFN-β	– Interferon beta
IFN-γ	– Interferon gama
IL-1	– Interleucina 1
IL-6	– Interleucina 6
IL-10	– Interleucina 10
mAChR	– Receptor de acetilcolina muscarínico
nAChR	– Receptor de acetilcolina nicotínico
PPEM	– Forma progressiva primária da esclerose múltipla
PSEM	– Forma progressiva secundária da esclerose múltipla
RREM	– Forma remitente-recorrente da esclerose múltipla
SNC	– Sistema nervoso central
SNP	– Sistema nervoso periférico
TNF-α	– Fator de necrose tumoral alfa
vAChT	– transportador de acetilcolina vesicular

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 MANUSCRITO	39
Alterações na atividade das colinesterases e adenosine desaminase e níveis de biomarcadores de inflamação em pacientes com esclerose múltipla	39
Abstract.....	41
Introduction	42
Methods	44
Results	47
Discussion	48
Acknowledgements.....	52
Disclosures.....	52
References.....	52
4 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	71

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem no item Introdução desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas para a publicação da revista científica *Journal of Neurology*.

1 INTRODUÇÃO

Na maioria dos neurônios, a passagem do impulso nervoso necessita da presença da bainha de mielina, para que ocorra o processamento da informação, e assim, as tarefas impostas ao indivíduo, possam ser executadas corretamente. A bainha de mielina facilita a condução do impulso nervoso, através do aumento da velocidade do impulso elétrico, pela condução “saltatória”, gerando assim, uma comunicação rápida entre sistema nervoso central (SNC) e o restante do corpo (CASTRO; BRIBIÁN; ORTEGA, 2013). Essa estrutura membranosa é sintetizada pelos oligodendrócitos presente no SNC e pelas células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP).

No entanto, pode ocorrer um comprometimento nesta homeostase do sistema nervoso, em um processo conhecido como desmielinização (Figura 1), o qual é caracterizado por danos ou perda da bainha de mielina que reveste os axônios, geralmente acompanhada de infiltração perivascular de linfócitos, glóbulos vermelhos e células mononucleares (PEIREIRA et al., 1996). São referidas como doenças desmielinizantes, as patologias que causam danos ou destruição das bainhas de mielina no SNC e SNP (BUTTMANN; KAVERI; HARTUNG, 2013). Dentre estas doenças que provocam desmielinização no SNC, em humanos, destaca-se a esclerose múltipla (EM).

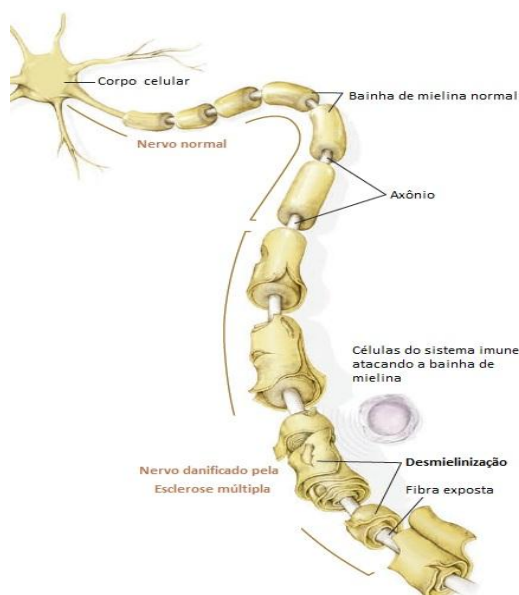


Figura 1 – Representação da bainha de mielina normal e após o processo de desmielinização (Adaptado de MALONI, 2013).

As primeiras descrições clínico-patológicas da EM tiveram início em 1858, com Jean Charcot, que realizou uma tentativa inicial de critérios diagnósticos para esta doença, e a chamou primeiramente de “esclerose em placas disseminadas”. Mais tarde esta foi descrita como “esclerose disseminada” e somente, na década de 1960 ficou conhecida como “esclerose múltipla” (GAFSON; GIOVANNONI; HAWKES, 2012). As palavras escolhidas para caracterizar a doença foram escolhidas devido às múltiplas áreas de cicatrização (esclerose) que representam vários focos de desmielinização no SNC. Assim deram-se prosseguimento a vários estudos, e apenas em 1949, Elvin Kabat confirmou que havia um componente imunológico nesta doença, através da detecção do aumento de imunoglobulinas no líquido de pacientes (MOREIRA et al., 2002).

A EM é uma desordem desmielinizante e neurodegenerativa (KOUTSOURAKI; COSTA; BALOYANNIS, 2010), sendo a principal doença de caráter inflamatório que afeta o SNC (REYNOLDS et al., 2011). Representa a causa mais comum de incapacidade neurológica crônica não traumática em adultos jovens, gerando assim, grande impacto econômico à sociedade, pois, muitas vezes estes indivíduos em plena idade economicamente ativa, acabam afastando-se de suas atividades laborais (REIPERT, 2004; JORDY; TILBERY; FAZZITO, 2008; HASSAN-SMITH; DOUGLAS, 2011; ELLIS; MOTL, 2013).

Além disso, é considerada uma doença autoimune, caracterizada por neuroinflamação e neurodegeneração no SNC (DARVESH et al., 2010; KIPP; STAR; VOGEL, 2012). Ocorre agregação de múltiplas placas de desmielinização na substância branca encefálica e medular (GEURTS; BARKHOF, 2008), que levam a perda multifocal de mielina e destruição de axônios (BRUCK, 2005; COMPSTON; COLES, 2008), podendo atingir o cérebro e a medula espinhal. Esta patologia apresenta episódios repetidos de disfunção neurológica com remissão variável (COSTA et al., 2005).

De acordo com a *World Health Organization* (WHO, 2008) a incidência média de EM no mundo é 2,5/100.000 habitantes e a prevalência é 30/100.000 habitantes. Estudos estimam que haja em torno de 2 a 2.5 milhões de casos de EM no mundo, entretanto, a incidência é maior em populações que residem em áreas de clima temperado (JORDY; TILBERY; FAZZITO, 2008) e maiores latitudes, como, por exemplo, o Canadá, os Estados Unidos, a Escócia e a Suécia (MILO; KAHANA, 2010; DOBSON; GIOVANNONI; RAMAGOPALAN, 2013), sugerindo que a

localização geográfica possui um papel importante na susceptibilidade à doença (KURTZKE, 2000).

No Brasil, a prevalência da EM, também apresenta grandes variações entre as regiões, sendo mais frequente no sul e sudeste do país do que no norte e nordeste (CARDOSO et al., 2006). Esta diferença é de aproximadamente 1,36 casos por 100.000 habitantes nas áreas equatoriais (FERREIRA et al., 2004) para 12,5 por 100.000 habitantes no sudeste (RIBEIRO et al., 2011). Além disso, pesquisas recentes têm evidenciado que indivíduos que nascem na primavera brasileira são mais propensos ao desenvolvimento desta patologia. Sendo que essa predisposição pode ser resultante da baixa exposição à luz solar durante os períodos críticos da gestação, com consequente deficiência de vitamina D, a qual auxilia na modulação do sistema imune (WILLER et al., 2005; BECKER et al., 2013). Conforme Finkelsztejn et al. (2009), o estado do Rio Grande do Sul é o segundo em números de internações hospitalares para o tratamento desta doença.

A EM afeta adultos jovens na faixa etária de 20 - 40 anos sendo a incidência maior no sexo feminino e na raça branca (HENRIKSEN; SORENSEN, 2011; TROJANO et al., 2012). É menor a incidência na raça negra (MARRIE, 2011), entretanto, pesquisas recentes relatam uma progressão mais exacerbada da doença em indivíduos afro-descendente (FERREIRA et al., 2010). Além disso, cabe ressaltar que a EM também vem sendo diagnosticada em crianças e adolescentes (NESS et al., 2007) demonstrando assim, que podem haver outros fatores relacionados com o aparecimento desta doença, como influência hormonal e genética (BANWELL et al., 2007).

Clinicamente, o indivíduo com EM pode apresentar uma variedade de sinais e sintomas neurológicos e o curso da doença, é bastante variável (LASSMAN, 2005), dependente da forma de EM e dos locais de lesões no SNC (KOUTSOURAKI; COSTA; BALOYANNIS, 2010). É comum aparecerem sintomas como: fadiga muscular crônica, espasticidade, visão dupla, além de déficits cognitivos, disfunção vesical e intestinal, dentre outras alterações (DeBOLT; McCUBBIN, 2004; KES et al., 2013). Entretanto, os sintomas mais comuns são déficits motores (fraqueza, fadiga e falta de equilíbrio) e sensitivos (hipoestésias ou anestésias), alterações visuais e esfinterianas (BEN-ZACHARIA, 2011).

Segundo Callegaro et al. (2001), após 10 anos do início dos sintomas, 50% dos pacientes poderão estar inaptos para realizarem atividades profissionais e até

mesmo, domésticas. Neste contexto, alguns estudos têm associado à degeneração axonal como determinante para o surgimento dessas incapacidades (CORREALE; MELI; YSRRAELIT, 2006). De acordo com a sintomatologia e achados clínicos, existem quatro diferentes subtipos conhecidos para a EM: forma remitente-recorrente, forma progressiva secundária, forma progressiva primária e a progressiva-recorrente (Figura 2) (Das UN, 2012; MALONI, 2013).

A maioria dos pacientes, cerca de 80% dos casos (NOSEWORTHY et al., 2000; STÜVE; OKSENBERG, 2010), inicia seu quadro clínico com a forma remitente-recorrente, também conhecida como surto remissão, caracterizada por episódios de desmielinização com episódios agudos de disfunção neurológica, seguidos por períodos de remielinização com remissão parcial ou completa dos sintomas e estabilidade clínica entre as recidivas (CONFAVREUX et al., 2000; REIPERT, 2004). Com o passar do tempo, a remielinização torna-se menos frequente e a forma remitente-recorrente de EM (RREM) transforma-se na forma progressiva secundária, comprometendo axônios e levando a um aumento irreversível dos déficits neurológicos (BJARTMAR; WUJEK; TRAPP, 2003). Alguns pacientes, no entanto, desde o início da doença manifestam sinais neurológicos progressivos, os quais caracterizam a forma progressiva primária da EM (REIPERT, 2004). Já a progressiva-recorrente é a forma menos frequente entre os pacientes e caracteriza-se por ser mais agressiva, uma vez que, os sinais e sintomas neurológicos não regridem. Sendo assim, há um declínio das habilidades físicas dos pacientes ao longo do tempo (SEIXAS et al., 2009).

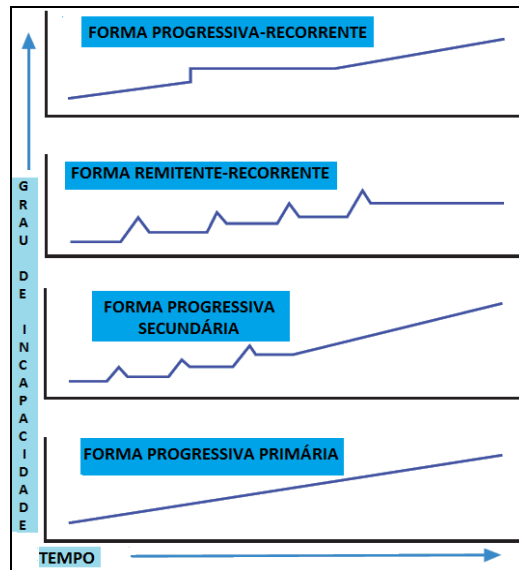


Figura 2 – Formas de esclerose múltipla (Adaptado de MALONI, 2013).

O diagnóstico e a classificação do subtipo clínico em que o paciente se enquadra são de difícil precisão, por conseguinte, baseados em diversos parâmetros como: achados clínicos referente às lesões, análise de fluido cérebro-espinhal, histórico do paciente e, estudos de imagem como a ressonância magnética de crânio e medula, um método não invasivo, bastante sensível para detecção de lesões no SNC (WAKERLEY; NICHOLAS; MALIK, 2008; FILIPPI; ROCCA, 2013).

Essa possível dificuldade na obtenção do diagnóstico advém da característica “flutuante” da doença, pois os sintomas surgem e muitas vezes desaparecem, com sinais neurológicos intermitentes. Assim, em alguns casos outros exames podem ser requeridos pelos neurologistas. Dentre eles, a verificação dos potenciais evocados, no qual ocorre o registro das respostas elétricas no encéfalo após diferentes estímulos exteroceptivos. Sendo que em indivíduos com EM observa-se uma resposta mais lenta ou bloqueada após estes estímulos, devido ao comprometimento na condução dos sinais nervosos (FERNÁNDEZ et al., 2012).

É neste cenário que vários critérios vêm sendo propostos para o diagnóstico desta doença desmielinizante, tendo iniciado com Charcot, através de análises de uma série de casos (MINGUETTI, 2001). Atualmente, o padrão adotado para estudos clínicos são os critérios de McDonald, propostos em 2001, mas com algumas retificações em 2010, que visam um diagnóstico mais rápido, com maior especificidade e sensibilidade (POLMAN et al., 2011).

Ressalta-se, ainda, que, a EM apresenta um curso, geralmente episódico com frequentes intervalos de exacerbações seguidos por períodos de remissões, assim, apresenta uma evolução variável e imprevisível (VAN HORSSSEN et al., 2011). Entretanto, a literatura mostra que quando as recidivas tornam-se mais frequentes em pacientes com a RREM, há um aumento de suas incapacidades (LUBLIN; BAIER; CUTTER, 2003). Mesmo com os déficits que se estabelecem, no decorrer dos anos, nos portadores de EM, estudos apontam uma expectativa de vida de aproximadamente 35 anos de vida, após o diagnóstico. No entanto, a maioria desses indivíduos morre cerca de 5 a 10 anos mais cedo que a população em geral (RUNIA; VAN PELT-GRAVESTIJN; HINTZEN, 2012).

Apesar dos investimentos em pesquisas com novos tratamentos para a EM, a sua cura ainda não foi encontrada. Assim, os sintomas desta doença são minimizados utilizando-se medidas farmacológicas, bem como, não farmacológicas, tais como: reabilitação, alterações no estilo de vida e suporte psicossocial (BENZACHARIA, 2011). Por conseguinte, o objetivo principal do tratamento é prevenir a progressão da doença, como também, o acúmulo de incapacidades motoras, cognitivas e sensitivas (COMPSTON, 2004).

O tratamento padrão para as recidivas da EM em pacientes com a RREM visando uma recuperação rápida e eficaz nos momentos de recaídas (surto), é o uso de glicocorticóides, dentre eles, a metilprednisolona intravenosa é a mais utilizada (ZIVADINOV et al., 2008). A administração desta droga é realizada através de pulsos cíclicos e a mesma, possui diversos mecanismos de ação (MOREIRA et al., 2002), podendo inibir a proliferação de células T e a produção de citocinas (TISCHNER; REICHARDT, 2007).

A primeira linha de terapia para o tratamento contínuo dos pacientes com a RREM é realizada através de administração de drogas imunomoduladoras, também conhecidas como modificadoras da doença, dentre estas pode-se citar: o interferon beta (IFN- β) e acetato de glatirâmer, para os quais existem vários nomes comerciais. Esses medicamentos são adotados por serem considerados modificadores da doença, pois induzem a remissão ou controle da EM, desse modo, retardam a sua progressão (McGRAW; LUBLIN, 2013). Estudos demonstram que, na maioria dos casos, ambos os tratamentos, são bem tolerados e eficazes (POHL et al., 2007). Em relação aos interferons (IFNs), esses são citocinas que ocorrem naturalmente, e que possuem propriedades anti-inflamatórias. Neste sentido, o IFN- β é uma forma

recombinante destas citocinas, utilizado para modular a resposta inflamatória, inibindo agentes pró-inflamatórios e aumentando mediadores anti-inflamatórios (KIESER, 2011). Já, o acetato de glatirâmer é uma combinação de quatro polipeptídeos sintéticos (L-ácido glutâmico, L-alanina, L-tirosina e L-lisina) que mimetizam a proteína básica de mielina, um dos principais componentes da bainha de mielina (KALA; MIRAVALLE; VOLLMER, 2011). Esta droga foi criada para competir com a proteína básica de mielina pela ligação ao complexo principal de histocompatibilidade, sendo capaz de afastar essa proteína das células apresentadoras de antígeno (SCHREMPF; ZIEMSEN, 2007).

Observando a crescente incidência da EM, alguns estudos têm divergido quanto à eficácia das terapias convencionais adotadas, como IFN- β e acetato de glatirâmer, alegando que estes fármacos não estão sendo eficazes para o tratamento desta desordem desmielinizante, pois, em muitos casos não conseguem controlar os linfócitos autorreativos (MOHYEDDIN BONAB et al., 2013).

Vale ressaltar, que os aspectos etiológicos desta doença ainda constituem o principal alvo de exaustivos estudos. Entretanto, a hipótese patogênica mais aceita é que a mesma seja oriunda de uma predisposição genética associada a um fator ambiental desconhecido que, ao se apresentarem num mesmo indivíduo, originariam uma disfunção no sistema imune (SOTGIU et al., 2004; COMPSTON; COLES, 2008). Essa disfunção mantém os linfócitos T ativados, os quais atravessam a barreira hematoencefálica (BHE), desenvolvem uma ação lesiva contra a mielina e os oligodendrócitos (AKTAS; WAICZIES; ZIPPI, 2007). Sendo assim, pode-se concluir que os principais eventos envolvidos nas lesões da EM incluem o rompimento da barreira hematoencefálica, inflamação, desmielinização e morte de oligodendrócitos (TRAPP; NAVE, 2008; DUTTA; TRAPP, 2011).

A BHE é um importante componente da rede de comunicação que conecta o encéfalo e a medula aos tecidos periféricos, além disso, funciona como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre o sangue e o SNC (CORREALE; VILLA, 2009). Sob condições fisiológicas, esta barreira não permite comunicação entre muitas substâncias químicas presentes no sangue e o SNC. No entanto, sua permeabilidade pode ser afetada pela ação das citocinas pró-inflamatórias (YU et al., 2008; HUPPERT et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que as citocinas possuem um papel importante na patogênese da EM. As citocinas pró-inflamatórias ativam o sistema imunitário

periférico e assim, direta ou indiretamente, afetam os oligodendrócitos e conseqüentemente a bainha de mielina (SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Após o rompimento da BHE e conseqüente passagem de linfócitos, ocorre a infiltração de células inflamatórias no SNC via circulação e esta resposta vem sendo associada com a inflamação durante os estágios iniciais da doença (HOCHMEISTER et al., 2006).

Sabe-se que, a hematopoiese envolve a produção de granulócitos, monócitos, células vermelhas do sangue, plaquetas e células progenitoras linfóides que podem diferenciar-se em linfócitos T, B ou NK (*natural killer*), dependendo do microambiente em que estão inseridas (GILBOA-GEFFEN; HARTMANN; SOREQ, 2012). Estas células respondem rapidamente a uma grande variedade de estímulos, tendo sua produção regulada por citocinas e quimiocinas, as quais são capazes de ativar essas populações celulares (CAVAZZANA et al., 2011).

A imunidade celular é realizada pelos linfócitos T, os quais se subdividem em: linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), que, quando ativados, atuam eliminando células infectadas, e em linfócitos T *helper* ($CD4^+$), que atuam secretando citocinas reguladoras do sistema imune (WEISSERT, 2013). Após ativação, as células T diferenciam em várias populações com diferentes funções, os linfócitos T *helper* liberam citocinas específicas que formam a base para a mediação celular/pró-inflamatória (Th1, Th17), a imunidade humoral/anti-inflamatória (Th2), e atividade de supressão/regulamentação (Tr1, Treg) (COMABELLA; KHOURY, 2012; MOHYEDDIN BONAB et al., 2013) (Figura 3).

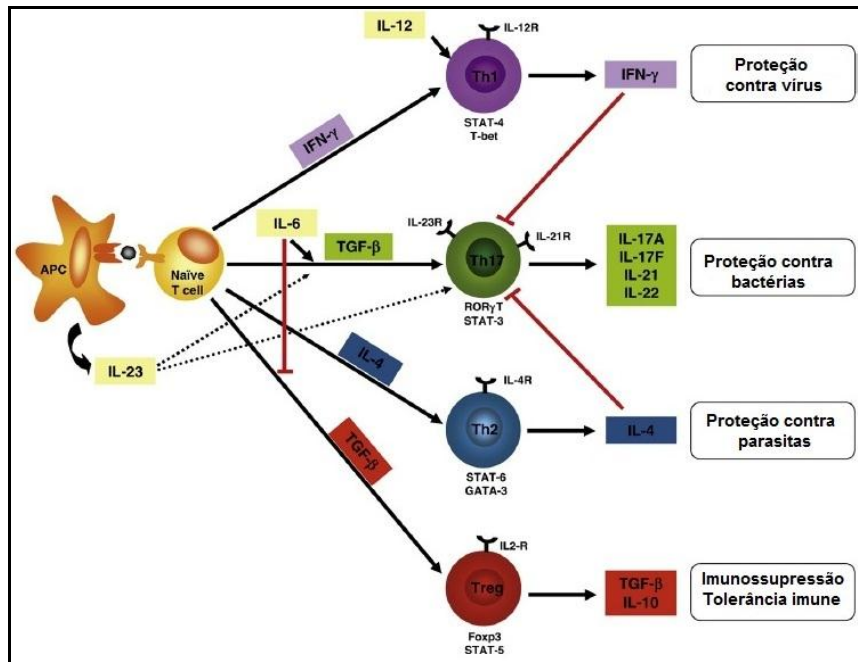


Figura 3 – Diferenciação funcional de células T (Adaptado de COMABELLA; KHOURY, 2012).

As células T são as principais responsáveis por impulsionar a resposta imune nos processos imunopatológicos (BUC, 2013). Estudos demonstraram que os linfócitos T e os macrófagos figuram entre os principais componentes dos infiltrados inflamatórios na EM (JUNKER et al., 2007; COMABELLA; KHOURY, 2012). É bem documentado na literatura, que as células T $CD4^+$ (Th1), e, por conseguinte, as citocinas pró-inflamatórias, estão associadas com a indução desta doença, bem como, com sua progressão (BEGOLKA et al., 1998).

Além disso, as células B também parecem estar intimamente relacionadas com o aparecimento de lesões desmielinizantes (FRISCHER et al., 2009) e com a promoção da neuroinflamação, através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como $TNF-\alpha$ e linfotoxinas (BAR-Or et al., 2010). Por outro lado, as células B também possuem propriedades imunossupressoras, pois elas podem aumentar a secreção de IL-10, e consequentemente, limitar a resposta de células T $CD4^+$ pró-inflamatórias (FILLATREAU et al., 2002). Assim, este cenário sugere que a EM apresenta um processo inflamatório mediado tanto pelo sistema imune celular quanto pelo humoral, os quais podem vir a contribuir para a desmielinização, dano axonal, e, por conseguinte, o surgimento da EM (FRANCIOTTA, 2008) (Figura 4).

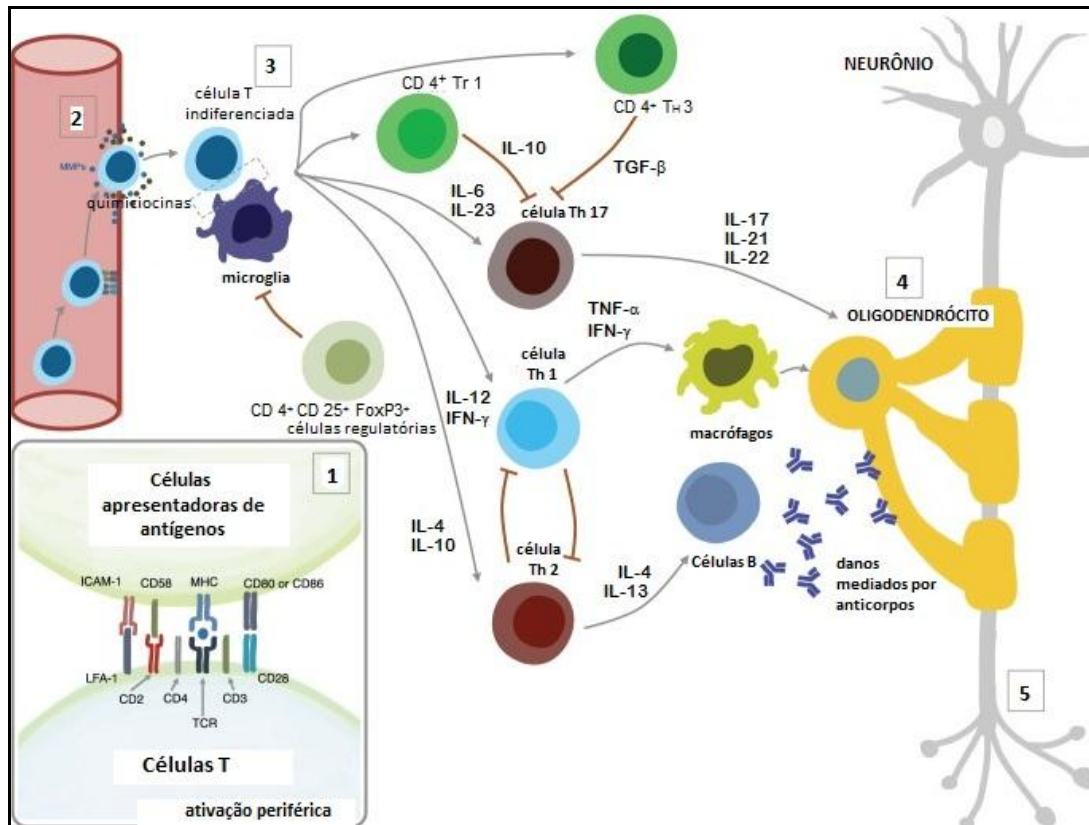


Figura 4 – Mecanismos envolvidos na patogênese da EM. (1) ativação periférica; (2) migração de linfócitos ativados através da BHE; (3) reativação de linfócitos T no SNC e secreção de mediadores pró-inflamatórios; (4) indução da desmielinização; (5) dano axonal (Adaptado de CORREALE et al., 2012).

Como já mencionado anteriormente, os mediadores pró-inflamatórios, estão diretamente ligados a doenças como a EM, contudo, não atuam apenas como reguladores, mas também, como efetores citotóxicos, uma vez que vários estímulos pró-inflamatórios são conhecidos por induzir a morte de oligodendrócitos (ANDREWS; ZHANG; BHAT, 1998; MOLINA-HOLGADO et al., 2001). Acredita-se que a imunopatogênese da EM esteja associada a um desequilíbrio entre as citocinas produzidas por Th1 e Th2 (COMABELLA; KHOURY, 2012).

Diante do exposto, a influência das citocinas na EM é extremamente importante, uma vez que o processo inflamatório inicia, este leva à produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas (IL-1), (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), os interferons (IFNs), e, à diminuição das citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Essa desproporção entre as citocinas pró e anti-inflamatórias também pode causar um aumento da produção de radicais livres (Das UM, 2012).

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina pleiotrópica expressa durante o desenvolvimento normal do SNC, bem como, aparece elevada em doenças inflamatórias desmielinizantes (VELA et al., 2002). Esta citocina é rapidamente regulada em resposta a insultos locais ou periféricos, medeia respostas de defesa em lesões locais e sistêmicas, neuroinflamação, morte celular, e em doenças crônicas degenerativas, tais como a EM (ROTHWELL; LUHESHI, 2000). Além disso, nesta patologia a IL-6, uma citocina pró-inflamatória, comumente mostra-se elevada (SCHÖNROCK; GAWLOWSK; BRÜCK, 2000). Segundo MATSUSHITA e colaboradores (2013), a IL-6 serve como um marcador de amplificação da resposta inflamatória, bem como, apresenta uma correlação positiva com o grau de incapacidades neurológicas dos pacientes com EM.

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) é classicamente uma citocina pró-inflamatória, ativado por macrófagos, podendo iniciar e sustentar a resposta inflamatória, contribuindo assim, para o surgimento de lesões no SNC (KOLLIAS et al., 1999).

Já o IFN- γ , atua como uma citocina homodímera, classicamente envolvida na defesa contra os vírus, mas também participa no combate a bactérias e tumores (FRICKE et al., 2006). Produzido pelas células NK e NKT que pertencem ao sistema imunológico inato, desempenha um papel importante tanto na imunoestimulação quanto na imunomodulação (PETERMANN; KORN, 2011), e estimula a diferenciação de células Th1, entretanto, inibe a diferenciação das células Th2 (SEDER; PAUL, 1994).

A IL-10, é uma citocina anti-inflamatória, imunoregulatória que pode ser utilizada como um biomarcador na EM (BIELEKOVA; MARTIN, 2004). Essa interleucina reduz os danos celulares e, por conseguinte, melhora a reparação de lesões em doenças inflamatórias desmielinizantes, através da proteção aos oligodendrócitos e seus progenitores (MOLINA-HOLGADO et al., 2001). A literatura mostra que, a terapia com IFN- β , leva a um aumento significativo na produção de IL-10 em indivíduos com a RREM, e este seria um resultado benéfico para os portadores da doença, pois gera uma redução de citocinas pró-inflamatórias, visando a homeostase (MIRANDOLA et al., 2009).

Estudos têm demonstrado que os níveis séricos de TNF- α e IFN- γ , apresentam-se elevados em pacientes com EM, durante a fase aguda da doença, podendo induzir ao aparecimento dos sintomas (HOHNOKI; INOUE; KOH, 1998).

Além disso, algumas pesquisas relatam um aumento nos níveis de IFN- γ e IL-6, bem como, do TNF- α e IL-10 em pacientes RRMS, sugerindo que, ainda há na fase de remissão clínica, um sistema complexo de citocinas pró e anti-inflamatórias, que podem interagir para modular a atividade e progressão da doença (KALLAUR et al., 2013).

A proteína C-reativa (CRP) é uma proteína de fase aguda, sintetizada no fígado, e sua produção é induzida por citocinas tais como, IL-1, IL-6 e TNF- α , (SELLNER; GREEVE; MATTLE, 2008). Esta proteína, também vem sendo utilizada como um marcador do grau de inflamação em pacientes com EM (HON et al., 2012).

Neste contexto, trabalhos têm mostrado uma correlação positiva entre o aumento dos níveis da CRP e episódios inflamatórios nas recidivas clínicas da EM (GIOVANNONI et al., 1996; HON et al., 2009), bem como a elevação dessa proteína está relacionada, muitas vezes, com maiores déficits e progressão da doença em pacientes com RRMS (SOILU-HÄNNINEN et al., 2005).

Vale salientar aqui que, o processo de desmielinização pode ser decorrente de vários mecanismos, dentre eles: o TNF- α e IFN- γ podem ser tóxicos para os oligodendrócitos, como as citocinas podem ativar macrófagos, que então fagocitam mielina, e também as citocinas pró-inflamatórias podem estar envolvidas na indução de apoptose e subsequente desmielinização (SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Em suma, a inflamação está presente em todas as fases da EM, tanto na fase aguda e conseqüentemente na forma remitente-recorrente, como também, nas formas progressivas da doença (FRISCHER et al., 2009). Assim, os processos inflamatórios em associação com a formação de espécies reativas, podem ser responsáveis pela progressão da doença (NEGRE-SALVAYRE et al., 2008).

Estudos demonstraram uma maior probabilidade ao aparecimento de outras doenças autoimunes, como por exemplo, psoríase e artrite reumatóide; em indivíduos portadores de EM, sugerindo que pode haver genótipos específicos que levam ao aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento da autoimunidade (BARCELLOS et al., 2006).

Apesar de ainda ser incerto o evento que leva ao surgimento desta doença, as características histológicas da EM, bem como a inflamação crônica, são eventos bem descritos na literatura. Supõe-se, que esses processos sejam decorrentes de uma disfunção na sinalização imune, levando a uma reação inflamatória persistente,

com tempo de sobrevivência maior das células imunológicas (CAPPELLANO et al., 2013).

O sistema colinérgico é uma das mais importantes vias de modulação do SNC. Os componentes desse sistema incluem: a acetilcolina (ACh); a colinaacetiltransferase (ChAT); o transportador de colina (ChT); o transportador de acetilcolina vesicular (VChT); os receptores muscarínicos (mAChR) e os nicotínicos (nAChR) e a acetilcolinesterase (AChE) (Figura 5). O papel clássico do sistema colinérgico tem sido atribuído ao seu papel na neurotransmissão colinérgica (KAWASHIMA; FUJI, 2000; SARTER; PARIKH, 2005), entretanto, a demonstração que linfócitos expressam todos os componentes da sinalização colinérgica tem apontado a importância desse sistema também na regulação das respostas imunológicas.

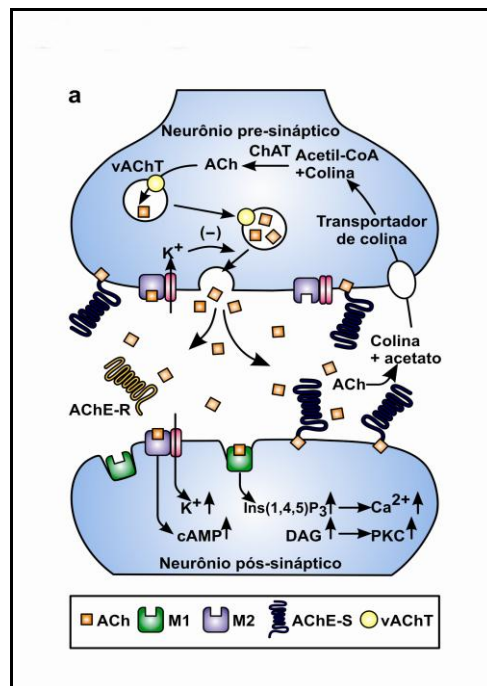


Figura 5 – Esquema da sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (vAChT) (Adaptado de SOREQ; SEIDMAN, 2001).

Algumas pesquisas apontam o nervo vago como um possível modulador da resposta imune e também, como responsável pelo controle da progressão de

doenças inflamatórias através da via “anti-inflamatória colinérgica”. Percebe-se, portanto, que há uma relação entre o sistema colinérgico e o imune, pois o nervo vago tem como principal neurotransmissor a ACh, e esta quando liberada na fenda sináptica, modula através de seus receptores, a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6 (TRACEY, 2007; 2009).

Além disso, os linfócitos também podem sintetizar e liberar a ACh, a qual tem sido considerada um agente imunomodulador (KAWASHIMA; FUJI, 2003a). A ACh age como um anti-inflamatório (WANG et al., 2003), pois regula a síntese de citocinas através de seu efeito agonista com os receptores do tipo $\alpha 7$ nicotínicos ($\alpha 7nAChR$). Após a ativação desses receptores expressos na superfície dos macrófagos, a ACh induz a uma diminuição na síntese de citocinas pró-inflamatórias produzidas por células (PAVLOV; TRACEY, 2005), e concomitantemente mantém a produção de citocinas anti-inflamatórias (MARRERO et al., 2011).

Os efeitos extracelulares da ACh podem ser mediados tanto pela ativação de receptores colinérgicos nicotínicos como muscarínicos (LUCAS-MEUNIER et al., 2003). Contudo, a ativação de receptores nicotínicos, promove o influxo de Ca^{++} intracelular, atenuando a resposta pró-inflamatória de tecidos periféricos (KIMURA et al., 2003; CARNEVALE; DE SIMONE; MINGHETTI, 2007), reforçando a idéia de que o sistema colinérgico linfocítico está envolvido na regulação da função imune via receptores de acetilcolina (AChRs) (KAWASHIMA; FUJII, 2003b; 2004).

Desse modo, as reações imunes podem ser moduladas através da interação e ativação desses receptores pela ACh, uma vez que esta molécula atua inibindo a liberação de citocinas como IL-1 e TNF- α (Das UN, 2007). Assim, no sistema nervoso, o sistema colinérgico não apenas medeia as interações neuroimunes, como também, pode servir como um regulador interno de respostas imunes (NIZRI et al., 2006). E ainda, conforme estudos realizados por Tyagi e colaboradores (2010), a via anti-inflamatória colinérgica regulada pelo $\alpha 7nAChR$, existente tanto no encéfalo como na periferia, pode ser um alvo terapêutico potencial para regular a neuroinflamação.

As funções da ACh no sistema imune irá depender da sua biodisponibilidade que pode ser controlada, por exemplo, na sua síntese e degradação (OLIVEIRA et al., 2012). O controle homeostático da ACh é efetuado por diferentes enzimas, conhecidas como colinesterases. Essas estão envolvidas na hidrólise de ACh em vias de sinalização neuronais como não neuronais (GIACOBINI, 2004). Dentre elas,

destaca-se a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), que é responsável pela degradação da ACh em colina e acetato (JAQUES et al., 2011).

A AChE está presente no encéfalo, junção neuromuscular, eritrócitos e linfócitos, e é essencial para regulação da quantidade de ACh na fenda sináptica (ANGLISTER et al., 2008), pois, determina a duração e a eficácia da neurotransmissão colinérgica (MASSOULIÉ et al., 1993; BRENNER et al., 2008). Além disso, atualmente vem sendo um importante alvo relacionado com as respostas imunes devido ao fato de estar presente tanto em linfócitos T quanto B, com maior expressão em células T (TAYEBAT et al., 2002).

Essa enzima tem sido alvo terapêutico de muitas doenças do SNC (SILMAN; SUSSMAN, 2005). Além do seu papel clássico na atividade catalítica, também executa funções na neurogênese, na adesão celular, na sinaptogênese, na hematopoiese e trombopoiese (SOREQ; SEIDMAN, 2001). Os inibidores das AChE, um vasto grupo de compostos químicos com diferentes propriedades físico-químicas, estão sendo muito utilizados para o tratamento de várias doenças com o objetivo de aumentar os níveis extracelulares de ACh, melhorando assim os déficits cognitivos relacionados com doenças neurodegenerativas (POHANKA, 2011). Entretanto, tem sido observado que essa classe terapêutica também pode atuar como agentes anti-inflamatórios reduzindo a proliferação de células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, sendo este mecanismo dependente da ativação do $\alpha 7nAChR$, resultando em aumento da concentração de ACh pela inibição da AChE (BRENNER et al., 2008). Estudos também apontam que esses agentes terapêuticos são promissores, no tratamento de várias desordens neurológicas, tais como, a doença de Alzheimer, demência senil, miastenia gravis e outras patologias que envolvam processos inflamatórios (MUKHERJEE et al., 2011).

De particular importância, estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que o tratamento com IFN- β diminuiu a atividade da AChE em estruturas cerebrais de ratos desmielinizados pelo brometo de etídio, sugerindo que os efeitos imunomoduladores desse medicamento pode estar associado com a sinalização colinérgica (MAZZANTI et al., 2006). Além disso, evidências indicam que a disfunção colinérgica, devido aos processos inflamatórios contra a bainha de mielina, contribui para o surgimento da EM (NIZRI et al., 2006) e que uma inibição na atividade da AChE pode gerar um efeito positivo em seu tratamento por aumentar os níveis de ACh (PORCEL; MONTALBAN, 2006). É importante destacar também

que, um aumento na atividade da AChE tem sido sugerido como marcador de inflamação sistêmica de baixo grau em várias doenças; dentre elas, patologias neurológicas, diabetes mellitus e hipertensão. Esse aumento, muitas vezes, ocorre simultaneamente a uma elevação nos níveis de CRP, IL-6 e TNF- α (Das UN, 2007).

Estudos já observaram um aumento na atividade da AChE em sangue total, bem como, em linfócitos, em patologias, como câncer de pulmão (ZANINI et al., 2013) e leucemia linfoblástica (BATTISTI et al., 2009) supondo-se uma estreita relação entre a elevação na atividade da AChE e a patofisiologia de doenças que geram alterações inflamatórias e imunes. Relatos na literatura sobre a atividade da AChE em linfócitos de portadores de EM são escassos, entretanto acredita-se que ela possa ter um papel relevante nessa patologia, uma vez que, a ACh liberada por essas células é responsável pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1, as quais tem sido descritas por terem um papel fundamental na patogênese da doença (KAWASHIMA; FUJI, 2003a; Das UN, 2007)

Além do envolvimento da AChE na regulação dos níveis plasmáticos de ACh, a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), também está relacionada a esse processo. A BChE é conhecida como uma colinesterase plasmática ou pseudocolinesterase, por não ser uma enzima específica para o substrato ACh (POHANKA, 2011). No entanto, a BChE é uma enzima capaz de hidrolisar uma grande variedade de ésteres incluindo ACh, presente no fígado, plasma, fluido cérebro-espinhal (JOKANOVIC, 2009). Esta é expressa em altos níveis na massa branca encefálica, na glia e em certas populações de neurônios (DARVESH et al., 2010). Além disso, o aumento da sua atividade, em várias condições clínicas pode servir como um marcador da inflamação sistêmica de baixo grau (Das UN, 2007).

A BChE pode servir como marcador de desordens neurodegenerativas, tendo em vista que também, pode atuar como um co-regulador na neurotransmissão colinérgica, bem como, atuar na proliferação celular e crescimento neurítico durante o desenvolvimento do sistema nervoso (DARVESH; HOPKINS; GEULA, 2003). Segundo Darvesh et al. (2010) essa enzima apresenta a sua atividade aumentada como consequência das lesões causadas pela EM, e isso poderia estar contribuindo para a ativação de respostas imunes e pró-inflamatórias. Além disso, dados da literatura demonstraram que doenças como Alzheimer e demência causam um aumento significativo na atividade dessa enzima, portanto, a inibição da BChE pode

ser benéfica no tratamento de patologias neurológicas (LANE; POTKIN; ENZ, 2006; Zhu et al., 2013).

Por fim, cabe ressaltar que, o aumento na atividade da AChE e da BChE refletem indiretamente em concentrações reduzidas de ACh que, por sua vez, irão reforçar eventos inflamatórios locais e sistêmicos, por conseguinte, ambas as colinesterases não servem apenas como alvos terapêuticos, mas também podem servir como marcadores para predizer o desenvolvimento de doenças com presença de processos inflamatórios (RAO; SRIDHAR; Das, 2007).

Além do sistema colinérgico, o envolvimento do sistema purinérgico também tem sido extensivamente estudado nas desordens que envolvem processos imunológicos e inflamatórios (SCHETINGER et al., 2007). Esse sistema é formado principalmente por: nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares; receptores através dos quais esses irão exercer seus efeitos; bem como, ectoenzimas responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares dessas moléculas (YEGUTKIN, 2008). Esses três componentes fazem parte da sinalização purinérgica, a qual vem sendo amplamente estudada devido ao seu importante papel na modulação de inúmeros processos, dentre eles, a neurotransmissão e a resposta imune e inflamatória (BOURS et al., 2006; ABBRACCHIO et al., 2009).

Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e AMP e seu correspondente nucleosídeo adenosina, ao se ligarem a receptores específicos são importantes moléculas de sinalização extracelular em vários tecidos (YEGUTKIN, 2008). Os nucleotídeos possuem afinidade por receptores P2, os quais segundo estrutura molecular são divididos em duas subfamílias: P2Y e P2X. Os receptores P2X (ionotrópico) e P2Y (metabotrópico) são expressos no SNC e participam do processo sináptico, estando assim particularmente associados com a neurotransmissão (MAJUMBER et al., 2007). A ativação de receptores purinérgicos, como o P2, altamente expressos em astrócitos, na microglia e linfócitos T pode induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a migração e a proliferação de células imunitárias que irão contribuir para o processo de desmielinização e lesão axonal (CIEŚLAK; KOMOSZYŃSKI, 2011).

O ATP exerce um importante papel em vários processos incluindo: a neurotransmissão, a trombo-regulação, o controle do tônus vascular, bem como a regulação de alterações imunes e inflamatórias (Di VIRGILIO et al., 2005; SEIFFERT et al., 2006). Assim, em resposta à estimulação celular, estresse ou dano tecidual o

ATP pode ser liberado no meio e reconhecido por células do sistema imunológico como um sinal de perigo, provocando assim, uma variedade de respostas pró-inflamatórias (JUNGER, 2011). Estudos têm demonstrado que essa molécula promove a estimulação e a proliferação de linfócitos T, sendo essencial para a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-2 e o IFN- γ (TRAUTMANN, 2009). Por outro lado, a adenosina, produto da hidrólise do ATP, desempenha um papel importante no controle do sistema imune inato e adaptativo, devido à inibição da proliferação de células T e secreção de citocinas (GESSI et al., 2007). Desse modo esse nucleosídeo possui tanto ação anti-inflamatória como imunossupressora (DEAGLIO et al., 2007).

A hidrólise dos nucleotídeos extracelulares ATP, ADP e AMP em seu respectivo nucleosídeo adenosina, é realizada por várias enzimas conhecidas como ectonucleotidases (ATKINSON et al., 2006), as quais estão ancoradas à membrana plasmática com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Dentre estas se destacam: E-NTPDases (Ecto-nucleotídeo trifosfato difosfoidrolase, EC 3.6.1.5), a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) e ecto-adenosina desaminase (ADA, EC 3.5.4.4) (YEGUTKIN, 2008). Juntas essas enzimas formam uma cadeia enzimática cuja atuação inicia com a ação da E-NTPDase, a qual catalisa a hidrólise do ATP e do ADP formando AMP. Na sequência, a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina, que logo após, é degradada pela ADA gerando inosina (ZIMMERMANN, 2001) (Figura 5).

marcador importante de linfócitos T e B (CHRISTENSEN; ANDERSEN; RYDER, 1996). Algumas citocinas como a IL-1, TNF- α , e a ativação da CRP são consideradas fortes indutores da expressão ecto-5'-nucleotidase (HUNSUCKER; MITCHELL; SPYCHALA, 2005). Além disso, tem sido demonstrado também, que esta enzima possui uma função relevante na adesão de linfócitos à células endoteliais vasculares, sendo este um evento importante na migração de linfócitos através da parede do vaso sanguíneo e em locais de inflamação (AIRAS; NIEMELÄ; JALKANEN, 2000).

Já em relação a ADA, esta é considerada uma enzima chave no metabolismo das purinas, pois catalisa a desaminação irreversível de adenosina e 2'-desoxiadenosina em inosina e 2'-desoxiinosina, respectivamente, e a mesma possui atividade maior em células T quando comparada a células B e eritrócitos (FRANCO et al., 2007; GESSI et al., 2007; SHAROYAN et al., 2006). Além disso, essa enzima possui um papel essencial na diferenciação, crescimento normal e proliferação de linfócitos (ALDRICH; BLACKBURN; KELLEMS, 2000), sendo sua atividade bastante relevante no desenvolvimento e manutenção do sistema imunitário (ZAVIALOV et al., 2010).

Pesquisas revelaram que a CD26, uma proteína de membrana, e o receptor de adenosina A1, são os responsáveis pelo ancoramento da ecto-ADA na membrana celular (YEGUTKIN, 2008). Tem sido relatado que a ecto-ADA ao interagir com a proteína CD26 expressa em linfócitos leva a um aumento na produção de células T e de citocinas pró-inflamatória. Esses achados sugerem que essa interação entre diferentes tipos de células atua no sistema imune (PACHECO et al., 2005).

Em humanos, já são conhecidas três isoformas moleculares da ADA: a ADA1, a ADA1+ CP, a qual é formada por duas moléculas de ADA1 combinadas por uma proteína de ligação (CP), e a ADA2 codificada por um gene separado de posição ainda desconhecida, sendo o papel fisiológico desta última forma ainda é pouco compreendido (UNGERER et al., 1995; ANDREASYAN et al., 2005). A ADA1 representa a maior parte da atividade da ADA total e, está presente em todos os tecidos, enquanto que, a ADA2 é a isoenzima predominante no soro (NIEDZWICKI; ABERNETHY, 1991).

É importante salientar aqui, que uma deficiência na ADA em humanos leva a anomalias no desenvolvimento de células T, B e NK, que por conseguinte altera a

formação e função dos linfócitos, bem como, gera uma variedade de disfunções sistêmicas (GASPAR et al., 2011). Estudos têm atribuído essa imunodeficiência, ao acúmulo de substratos para ADA, prejudicando o desenvolvimento e sobrevivência dos linfócitos, pois elevados níveis de adenosina poderiam provocar uma sinalização exacerbada do receptor de adenosina (ALDRICH; BLACKBURN; KELLEMS, 2000).

Os receptores de adenosina desempenham um papel central nos mecanismos de inflamação em várias patologias, pois após serem ativados ocorre uma redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias (DOS SANTOS JAQUES et al., 2013). Neste contexto, conforme Anwar e colaboradores (2013), o aumento na atividade da ADA pode conduzir a uma rápida desaminação da adenosina causando uma diminuição nos níveis extracelulares dessa molécula, o que poderia afetar a sensibilidade dos receptores de adenosina e desse modo, promover alterações nas respostas pró-inflamatórias.

Estudos relatam que os níveis da ADA em soro mostram-se elevados em várias condições patológicas, tais como distúrbios autoimunes, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), e tuberculose. Esses dados sugerem que o aumento na atividade dessa enzima possa estar envolvido no desenvolvimento dessas doenças (ANDREASYAN et al., 2005). Ungerer et al. (1992) demonstraram que os níveis de ADA em soro refletem a atividade e/ou quantidade de monócitos e macrófagos presentes em várias doenças de caráter inflamatório como: hepatite, mononucleose infecciosa, tuberculose, pneumonia e artrite reumatóide. Assim, alterações em sua atividade podem ser utilizada como um marcador bioquímico para a inflamação (SARI et al., 2003), bem como um indicador de distúrbios imunológicos (POURSHARIFI et al., 2009).

Cabe ressaltar que o nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que em várias condições patológicas, bem como, em modelos experimentais ocorrem alterações na atividade das enzimas do sistema purinérgico bem como das colinesterases, sugerindo que essas enzimas podem ser utilizadas como importantes marcadores de processos patológicos (MALDONADO et al., 2008; SCHMATZ et al., 2009; BAGATINI et al., 2011; LEAL et al., 2011; THOMÉ et al., 2012; PIMENTEL et al., 2013). De particular importância, estudos realizados com pacientes com a forma surto remissão da EM têm demonstrado que a atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA estão alteradas tanto em linfócitos quanto em plaquetas (SPANVELLO et al., 2010a,b) sugerindo que essas enzimas podem ter

um papel importante para preservação da integridade celular e para modular a resposta imune associada a essa doença desmielinizante. Entretanto, o papel da ADA em soro, bem como a atividade de colinesterases, ainda tem sido pouco investigado na EM.

Considerando-se o importante papel dos biomarcadores inflamatórios, o envolvimento do sistema colinérgico extraneural e o notável potencial imunomodulador dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, além do envolvimento da ADA em processos imunes e inflamatórios, torna-se relevante avaliar esses parâmetros em amostras de sangue de portadores de EM, uma vez que estes poderão futuramente ser úteis na clínica médica para o monitoramento desta doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade das colinesterases e da adenosina desaminase, bem como determinar a concentração de biomarcadores inflamatórios no sangue de pacientes com a forma remitente-recorrente da Esclerose Múltipla.

2.2 Objetivos específicos

Em pacientes com a forma remitente-recorrente da EM e em indivíduos saudáveis:

- Verificar a atividade da enzima acetilcolinesterase em sangue total e linfócitos;
- Determinar a atividade da butirilcolinesterase em soro;
- Avaliar a atividade da enzima adenosina desaminase em soro;
- Analisar os biomarcadores inflamatórios como: as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-10), o fator de necrose tumoral alfa, o interferon gama e a proteína C-reativa em soro;
- Quantificar os níveis de purinas no soro (ATP, ADP, AMP, adenosina, inosina, hipoxantina e ácido úrico).

3 MANUSCRITO

Alterações na atividade das colinesterases e adenosine desaminase e níveis de biomarcadores de inflamação em pacientes com esclerose múltipla

Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis

Carla Roberta Nunes Polachini^a, Roselia Maria Spanevello^b, Daniela Zanini^a, Luciane Belmonte Pereira^a, Caroline Curry Martins^a, Jucimara Baldissareli^a, Andréia Machado Cardoso^a, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^d, Pauline da Costa^a, Ana Lúcia Cervi Prado^e, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a,c}, Vera Maria Morsch^{a,c}

Submetido à revista *Journal of Neurology*.

**Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and
inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis**

Carla Roberta Nunes Polachini^a, Roselia Maria Spanevello^b, Daniela Zanini^a, Luciane Belmonte Pereira^a, Caroline Curry Martins^a, Jucimara Baldissareli^a, Andréia Machado Cardoso^a, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^d, Pauline da Costa^a, Ana Lúcia Cervi Prado^e, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a,c}, Vera Maria Morsch^{a,c*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

^c Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

^d Centro de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Campus Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^e Departamento de Fisioterapia e Reabilitação, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author

Address correspondence and reprint requests to:

Vera Maria Melchiors Morsch (veramorsch@gmail.com) Tel/Fax: + 55-55-3220-9557

Abstract

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 has unknown etiology characterized by the infiltration of lymphocytes and macrophages into the brain. The aim of this study was to evaluate the acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood, as well as butyrylcholinesterase (BChE) and adenosine deaminase (ADA) activities in serum. We also checked the levels of nucleotides, nucleosides, biomarkers of inflammation such as cytokines (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-10) and C-reactive protein (CRP) in serum from 29 patients with the relapsing-remitting form of MS (RRMS) and 29 healthy subjects as the control group. Results showed that AChE in lymphocytes and whole blood as well as BChE, and adenosine deaminase (ADA) activities in serum were significantly increased in RRMS patients when compared to the control group ($P < 0.05$). In addition, we observed a decrease in ATP levels and a significant increase in the levels of ADP, AMP, adenosine and inosine in serum from RRMS patients in relation to the healthy subjects ($P < 0.05$). Results also demonstrated an increase in the IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 and CRP ($P < 0.05$) and a significant decrease in the IL-10 ($P < 0.0001$) in RRMS patients when compared to control. Our data suggest that biomarkers of inflammation and hydrolysis of nucleotides and nucleosides are altered during the relapsing-remitting form of MS, as well as the enzyme activity important for proper immune and inflammatory response.

Keywords Multiple sclerosis - Cholinesterases - Lymphocytes - Adenosine deaminase - Inflammation - Cytokines.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease characterized by neurodegeneration and neuroinflammation in the central nervous system (CNS) [1]. In the MS, it occurs the aggregation of multiple plates of demyelination in the brain and spinal cord white matter [2]. MS presents episodes of neurological dysfunction with variable remission [3] and it is considered one the most common causes of neurological disability in young adults [4, 5] and the incidence is higher in women than in men [6]. It can be present in different forms, such as primary progressive (PPMS), secondary progressive (SPMS), progressive relapsing (RPMS) and relapsing-remitting (RRMS), which is the most prevalent form (80% cases) [7, 8].

The etiology of MS remains unclear; however studies have demonstrated that autoimmune T cells, targeting myelin components play a role in mediating inflammatory process, particularly in the early stages of RRMS [9]. This dysfunction in the immune system keeps T lymphocytes activated crossing the blood brain barrier and developing a harmful action against myelin and oligodendrocytes [10].

Several mediators are able to modulate the actions of lymphocytes; among these we can highlight acetylcholine (ACh). This molecule synthesized and released from lymphocytes is considered an immunomodulatory agent [11]. According to experiments in humans, it acts in various nonneuronal cells, such as in immune system and blood cells [12]. Recently it was demonstrated that it acts as anti-inflammatory and thus induces a decrease in the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages [13].

The homeostatic control of ACh is performed by different enzymes, among them acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), which is responsible for the degradation of ACh into metabolites choline and acetate [14]. In addition, butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) is an enzyme capable of hydrolysing a variety of esters including ACh [1]. Several studies have shown that the activities of these enzymes are altered in inflammatory diseases [15, 13], such as Alzheimer's disease and diabetes mellitus [16].

Apart from the involvement of ACh in pro- and anti-inflammatory events, ATP and adenosine also contribute to the fine-tuning of inflammatory and immune responses [17]. Adenine nucleotides and nucleosides, including adenosine triphosphate (ATP) and adenosine, are important signaling molecules that exert

regulation of immune defenses [18, 19]. In pathological conditions, high levels of ATP act as a pro-inflammatory agent [20], whereas, its breakdown product, adenosine, exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action [21].

Adenosine is produced in high concentrations under metabolic unfavorable conditions. Its concentration is normally regulated through the catabolism of adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) [22]. This enzyme is considered a key enzyme in purine metabolism; it acts inactivating the adenosine [23] and its regulation happens through the cytokines on the cell surface during T cell activation [24].

During MS a chronic inflammatory process occurs leading to the production of a variety of pro-inflammatory cytokines, such as interleukins (IL-1 and IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and interferons (IFNs). Moreover, a reduction in anti-inflammatory cytokines such as IL-10 possibly occurs, and this cytokine imbalance concerning pro- and anti-inflammatory leads to an increased production of free radicals [7]. C-reactive protein is an acute phase protein synthesized in the liver and it can be used as a potential marker of inflammatory activity and prognosis in MS. Also, its production is induced by cytokines such as IL-6, IL-1 and TNF- α [25, 26].

Other studies have already been performed in human and animal models of MS. Our research group has already investigated the AChE activity in brain structures (*in vitro* and *in vivo*) in animal models of MS induced with etidium bromide treated with Interferon- β , cyclosporine A, vitamin E e ebselen [27-29]. This same model was used to evaluate the role of purinergic system in lymphocytes and synaptosomes as well as stress oxidative parameters [30, 31]. Moreover, activities of the enzymes of the purinergic system have been checked in lymphocytes and platelets from patients with MS [32, 33]. Therefore, it is of our interest to continue elucidating mechanisms of this disease in RRMS patients.

Based on all the points raised above as well as due to the mechanisms still poorly understood in relation to the pathogenesis of this disease and considering the scarcity of reports in the literature involving the action of cholinesterase enzymes in the blood of patients with MS, the aim of this study was to assess the role of key regulatory enzymes of the immune system in lymphocytes, serum and whole blood. Furthermore, we studied the inflammatory profile of patients with MS in order to cooperate for a better understanding of this neurodegenerative disease.

Methods

Study population

The sample consisted of 29 patients with MS and 29 healthy subjects as a control group. The diagnosis of MS was based on the McDonald criteria [34], and all patients had the relapsing-remitting form (RRMS). Most patients were treated with current immunosuppressive therapy. The general characteristics of the patients are shown in Table 1. All subjects gave written informed consent to participate in this study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 23081.007854/2007-44. Twelve milliliters of blood was obtained from each patient and used for lymphocyte preparation and other biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group.

Isolation of mononuclear cells from human blood

Mononuclear leukocytes were isolated from human blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [35]. Despite the fact that the methodology described above is employed for separating mononuclear cells, the study performed by Jaques et al. [36] demonstrated that there is a high incidence of lymphocytes in these samples and the amount of monocytes is practically insignificant. For this reason we treat the samples as containing only lymphocytes. Lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells, excluding 0.1 % trypan blue and measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity [37]. These samples were used for the assay of enzymatic AChE.

AChE enzyme assay in lymphocytes

After lymphocyte isolation, AChE activity was determined as described by the colorimetric method of Ellman et al. [38] modified by Fitzgerald et al. [39]. The reaction mixture was composed of 1.0 mM acetylthiocholine, 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) and 100 μ L of the intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction. The proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg/mL. The absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm before and after incubation for 30 min at 27°C. All

samples were run in triplicate and the specific activity of lymphocyte AChE was calculated from the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content, and results are expressed as $\mu\text{mol/h/mg}$ of protein.

AChE enzyme assay in the whole blood

For AChE activity in whole blood with EDTA, samples were hemolyzed with phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 containing Triton X-100 (0.03 %) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 week.

Whole blood AChE activity

Whole blood AChE activity was determined by the method of Elman et al. [38] modified by Worek et al. [40]. With the purpose of reaching the appropriate temperature and complete reaction of sample matrix sulfhydryl groups with DTNB, the mixture was incubated for 10 min prior to the addition of substrate. The enzyme activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and DTNB degradation. The BChE was inhibited by ethopropazine. The AChE activity was measured at 436 nm and $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ using polystyrene cuvettes. The activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and protein content, and results are expressed as $\mu\text{mol/h/mg}$ of protein.

Blood serum collect

The blood was collected in vacutainer tubes without an anticoagulant system and centrifuged at $2500 \times g$ for 10 min at room temperature. The clot was discarded and the serum was used for the determination of the BChE and ADA activities, as well as purine levels, TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-10 and CRP.

Serum butyrylcholinesterase (BChE) activity

BChE activity was performed in serum. The BChE enzymatic assay was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. [38] as previously described by Rocha et al. [41]. The reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25°C . The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8

mM butyrylthiocholine iodide (BuSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in $\mu\text{mol BuSCh/h/mg}$ of protein.

Adenosine deaminase (ADA) activity determination

ADA activity in serum was determined according to Guisti and Galanti [42]. Briefly, 50 μL of serum reacted with 21nmol/L of adenosine, pH 6.5 and was incubated at 37°C for 60 min. This method is based on the direct production of the ammonia when ADA acts in excess of the adenosine. Results were expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1mmol the ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

Analysis of purine levels in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC)

The denaturation of sample proteins was performed using 0.6mol/L perchloric acid. All samples were then centrifuged (14000 \times g for 10min) and the supernatants were neutralized with 4.0 N KOH and clarified with a second centrifugation (14000 \times g for 15 min). Aliquots of 50 μL were applied to a reverse-phase HPLC system using a 25 cm C18 Shimadzu column (Shimadzu, Japan) at 260 nm with a mobile phase containing 60mM KH_2PO_4 , 5.0mM tetrabutylammonium chloride, pH 6.0, in 30% methanol according to a method previously described by Voelter et al. [43]. The peaks of purines (ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, hypoxanthine, and uric acid) were identified by their retention times and quantified by comparison with standards. Results are expressed by the amount of the different compounds per mL of serum.

Quantification of Cytokines

Cytokine quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-10 (eBIO-SCIENCE, San Diego, USA), according to the manufacturer's instructions. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader.

Determination of C-reactive protein (CRP)

Values of serum CRP were determined from samples analyzed by high-sensitivity latex-enhanced nephelometry on a BN II Nephelometer (Dade Behring,

Siemens). The assay used monoclonal anti-CRP antibodies and a calibrator that was traceable to the World Health Organization (WHO) reference material. The mean replicate coefficient of variation for the assay is 6.4%.

Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [44] using serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Student's t-test for independent samples. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all analyses used. All data were expressed as mean \pm SEM.

Results

Table 1 presents general characteristics of the patients. We observed that MS affected women more than men and the onset of MS tended to be earlier in men (age 13) than in women (age 18). Most patients evaluated had the RRMS form and the treatment used for the majority of the patients was glatiramer acetate.

Figure 1 shows that the AChE activity was significantly increased in lymphocytes from RRMS patients (1.14 ± 0.09) when compared with the control group (0.87 ± 0.07) ($P < 0.05$). AChE in the whole blood and BChE in serum activities are shown in Figures 2 and 3, respectively. We observed a significant increase in the activity of these enzymes in RRMS patients (AChE: 449.5 ± 21.49 /BChE: 8.92 ± 0.61) when compared with the control group (AChE: 384.5 ± 17.8 /BChE: 6.90 ± 0.49) ($P < 0.05$).

The ADA activity (Fig. 4) was higher in patients than in the control group (20.63 ± 1.19 / 13.66 ± 0.59) ($P < 0.0001$). In addition, nucleotide and nucleoside levels evaluated by HPLC revealed a decrease in ATP levels and a significant increase in the levels of ADP, AMP, adenosine, and inosine in serum from RRMS patients in relation to healthy subjects (Table 2) ($P < 0.05$). No differences were observed in the levels of hypoxanthine and uric acid comparing MS patients and the control group (Table 2).

Figure 5 presents the results obtained for cytokine levels. As can be observed, in both IL-1 (Fig. 5a) and IL-6 (Fig. 5b) the levels were significantly increased in RRMS patients when compared with the control group ($P<0.0001$). Moreover, levels of TNF- α (Fig. 5c) and IFN- γ (Fig. 5d) also presented a significant increase in patients when compared with the control group ($P<0.05$). However, we found a significant decrease in the IL-10 (Fig. 5e) levels in RRMS patients when compared with the control group ($P<0.0001$).

Statistical analysis revealed that RRMS patients had a significant increase in the CRP levels in serum when compared with healthy individuals (Fig. 6, $P=0.022$).

Discussion

It has long been known that immune cells attack the nervous system to give rise to neuroimmunological diseases, such as MS [45]. This disease is accompanied by several inflammatory manifestations, demyelization, and axonal loss [46], being that alterations in the immune system are intimately related to these processes.

Several studies including of our research group have reported that both purinergic [47-49] and cholinergic systems are important in the modulation of the inflammatory and immune responses [27, 50].

Our results corroborated other studies performed by Nakatsuji et al. [51] and Ramagopalan et al. [52] showing that the incidence of RRMS was higher in women than in men. Another important aspect observed in our work is that the vast majority of patients with EM have mean age at onset of the disease 30 years [53-55].

We have also observed an increase in the AChE activity in lymphocytes and whole blood of MS patients (Figs. 1, 2). It is well established in the literature that lymphocytes present AChE activity [56], which is expressed in T and B cells [57]. Hence, immunological activation of lymphocytes appears to enhance local cholinergic signal transmission between T and B cells, by increasing synthesis and release of ACh by T cells [58].

Over the last decade it has been established that both muscarinic and nicotinic ACh receptors are present in lymphocytes isolated from peripheral blood, and when stimulated by these receptors they cause a variety of biochemical and functional effects [59]. The results found in this study indicated a possible reduction in the ACh levels in blood and a consequent decrease in the neuroprotective and anti-

inflammatory properties promoted by this molecule, contributing to the immunological and inflammatory changes observed in patients with MS. A similar result in the AChE activity in whole blood was observed in a study carried out in our research group with individuals diagnosed with acute lymphoblastic leukemia [60] and lung cancer [61].

Mack et al. [62] have reported that neurodegenerative diseases may induce changes in the cholinesterase activities. We have also shown in this study that the BChE activity increased in the group of patients with MS (Fig. 3). BChE may be involved in activated microglia in MS and may lead to increased hydrolysis of ACh [1], while AChE can be considered a marker of early differentiation [63]. It is important to note that ACh inhibits the production of pro-inflammatory cytokines in leukocytes therefore the cholinergic parameters are important in inflammatory diseases [64].

The increase in the cholinesterase activities found in this study could be contributing to the pro-inflammatory immune response in RRMS patients, since a reduction of acetylcholine levels would in turn reduce the cholinergic input to the immune cells. This response could lead to the release of pro-inflammatory cytokines and promote neuroinflammation according to Darvesh et al. [1]. Evidence suggests that the inhibition of AChE activity may have a positive effect in the treatment of MS [65]. Another important aspect reported in previous studies is that the inflammation in the myelin sheath generates a cholinergic dysfunction that contributes to the onset of MS [66].

Beyond the extraneural cholinergic system, present in the lymphocytes, also it controls the immune system that is regulated by cytokines [11]. It is known that ACh can interact with $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors expressed by macrophages and other cytokine-producing cells and thus this mechanism regulates pro-inflammatory cytokine synthesis [67]. Moreover, this molecule reduces the production of TNF- α , IL-1, IL-6 [68]. Thus, we can speculate that the increase in the cholinesterase activity found in this study may be caused by an impairment of ACh ability. Also, alterations in cytokine levels found in this study may be due to the decrease of ACh levels, since ACh is responsible for regulating inflammatory processes.

Another important aspect to be discussed is that the pro-inflammatory cytokine levels were also increased in RRMS patients (Fig. 5a-d); however, the IL-10, a molecule with anti-inflammatory properties, was decreased in this population (Fig. 5e). The IL-10 plays an important role in the regulation of immune responses and is

considered the main anti-inflammatory cytokine [69]. These findings indicate that the inflammatory process is well characterized in patients with RRMS, since in this study we verified a reduction of IL-10 and simultaneously an increase of pro-inflammatory cytokines in the patient group.

Regarding IFN- γ and TNF- α , we observed an increase of these cytokines in the patient group when compared with the control group. As described by Bansi et al. [70], these findings may be associated with the course of the disease. Reinforcing this line of reasoning, Killestein et al. [71] demonstrated that patients with PPMS express less pro- and more anti-inflammatory cytokine, decreasing the production of T cells compared to the RRMS and SPMS forms of the disease.

In addition, a significant increase in the CRP levels in RRMS patients was found in this study (Fig. 6). These findings confirm previous reports that have showed a significant elevation of TNF- α , CRP, IL-1 in RRMS patients and the onset of the disease before 30 years when compared to healthy controls [72].

In the present study, most RRMS patients performed the treatment with glatiramer acetate in relation to IFN- β (Table 1). It is important to point out that, even making use of immunomodulator therapy, the RRMS patients remained with inflammatory biomarkers elevated when compared to healthy subjects. However, the literature has demonstrated that the introduction of immunomodulatory drugs, such as the interferon β (IFN- β) and glatiramer acetate for the treatment RRMS has been well accepted and most of the times effective for the reduction of relapses and deficiencies in MS patients [73-75].

In this scenario, we suggest that the increase in biomarkers of inflammation was probably a result not only of the elevation in the inflammation production due to the demyelization event that occurred in MS but also of the increased activity of cholinesterase discussed previously. Furthermore, it has been demonstrated in literature that adenine nucleotides and nucleosides play a fundamental role in inflammation process. ATP is considered the pro-inflammatory molecule, whereas adenosine has anti-inflammatory actions. In this context, our results demonstrate an increase of ADA activity in serum from patients with MS (Fig. 4). ADA is an important enzyme that degrades adenosine to inosine, tightly regulating local extracellular concentrations of adenosine [23, 76].

It is well established that adenosine receptors (ARs) play a central role in mechanisms of inflammation, suggesting that their stimulation has a different effect

on the release of pro-inflammatory cytokines in various pathologies [77]. In line with this, it is important to note that the increase in the pro-inflammatory cytokine levels observed in this study may be associated with an increase of ADA activity in RRMS. Our results are in agreement with several studies which have showed that ADA has significant roles in immune response, and alterations in their activities have been observed in some autoimmune diseases, such as lupus [78] and rheumatoid arthritis [79].

Previous studies carried out in our laboratory have demonstrated that ADA is an enzyme that plays an important role in inflammation mechanisms. Also, alterations in its activity have been observed in various diseases being very important physiological and pathological parameters [33, 80, 81].

We have observed that the levels of ATP, ADP, AMP, adenosine and inosine were altered in patients with MS compared to controls. These levels were significantly increased in the serum of MS from the patient group, with exception of ATP that showed decreased levels, which may be a result to the increase of purine metabolism observed in this work. Furthermore, evidence indicates that high extracellular ATP levels act through specific cell surface receptors as a pro-inflammatory agent that potentiates the release of pro-inflammatory cytokines [17] from activated lymphocytes [82].

Similar results have demonstrated that ATP levels were also decreased; nevertheless, the AMP and adenosine levels as well as ADA activity were increased in chronic disease [83]. The increase of ADP and AMP hydrolysis contributes to an increase of adenosine production. Based on our findings, we may suggest that a rapid deamination of adenosine by ADA causes a reduction of the levels of this nucleoside in the circulation. Consequently, this situation may produce a favorable scenario for the development of inflammatory diseases.

In conclusion, results found in the present study have demonstrated alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities, enzymes that are fundamental to control the activity of the immune system alterations in cytokines and CRP levels, as well as in the adenine nucleotide and nucleoside hydrolysis from patients with RRMS. These findings are of great relevance, since they can potentially contribute to the enlargement of the therapeutic window for the treatment of holders of this disease and, thus, improve the prognostic of these individuals through the development of new therapies.

Acknowledgements

The authors wish to thank the neurologist Juarez Lopes and the MS patients and healthy subjects that contributed for the realization of this study. We also thanks the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), 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 the financial support.

Disclosures

This work is original and is not under consideration by another journal. All the patients signed the 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 authors and has no conflict of interest.

References

1. Darvesh S, Leblanc AM, Macdonald IR, Reid GA, Bhan V, Macaulay RJ, Fisk JD (2010) Butyrylcholinesterase activity in multiple sclerosis neuropathology. *Chem Biol Interact* 187:425-431
2. Minguetti G (2001) Ressonância Magnética na Esclerose Múltipla, análise de 270 casos. *Arq Neuropsiquiatr* 59:563-569
3. Costa CCR, Fonteles JL, Praça LR, Andrade AC (2005) O adoecimento do portador de esclerose múltipla: percepções e vivências a partir da narrativa de dois casos clínicos. *RBPS* 18:117-124
4. Jordy SS, Tilbery CP, Fazzito MM (2008) Immunomodulator therapy migration in relapsing remitting multiple sclerosis: a study of 152 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 66:11-14

5. Reipert B (2004) Multiple sclerosis: a short review of the disease and its differences between men and woman. *J Mens Health Gend* 1:334-340
6. Koch-Henriksen N, Sorensen PS (2011) Why does the north-south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the northern hemisphere? *J Neurol Sci* 311:58-63
7. Das UN (2012) Is multiple sclerosis a proresolution deficiency disorder? *Nutrition* 28:951-958
8. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517
9. Lassmann H (2005) Mechanisms of multiple sclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2:447-452
10. Aktas O, Waiczies S, Zipp F (2007) Neurodegeneration in autoimmune demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets. *J Neuroimmunol* 184:17-26
11. Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci* 72:2101-2109
12. de Almeida JP, Saldanha C (2010). Nonneuronal cholinergic system in human erythrocytes: biological role and clinical relevance. *J Membr Biol* 234:227-234
13. de Oliveira P, Gomes AQ, Pacheco TR, Vitorino de Almeida V, Saldanha C, Calado A (2012) Cell-specific regulation of acetylcholinesterase expression under inflammatory conditions. *Clin Hemorheol Microcirc* 51:129-137
14. Jaques JA, Rezer JF, Gonçalves JF, Spanevello RM, Gutierrez JM, Pimentel VC, Thomé GR, Morsch VM, Schetinger MR, Leal DB (2011) The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. *Cell Biochem Funct* 29:703-707
15. Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R, Marrero MB (2011) Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases. *Cell Mol Life Sci* 68:931-949

16. Das UN (2007) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 13:214-221
17. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112:358-404
18. Zimmermann H. ATP and acetylcholine, equal brethren (2008) *Neurochem Int* 52:634-648
19. Ferrero ME (2011) Purinoceptors in inflammation: potential as anti-inflammatory therapeutic targets. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16:2172-2186
20. Gombault A, Baron L, Couillin I (2012) ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol* 3:414
21. Linden J (2006) New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 116:1835-1837
22. Gessi S, Varani K, Merighi S, Fogli E, Sacchetto V, Benini A, Leung E, MacLennan S, Borea PA (2007) Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal* 3:109-116
23. Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallo J, Canela EI, Lluís C (1997) Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 52:283-294
24. Cordero OJ, Salgado FJ, Fernández-Alonso CM, Herrera C, Lluís C, Franco R, Nogueira M (2001) Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol* 70:920-930
25. Sellner J, Greeve I, Mattle HP (2008) Atorvastatin decreases high-sensitivity C-reactive protein in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14:981-984
26. Gabay C, Kushner I (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses **to** inflammation. *N Engl J Med* **340:448-454**

27. Mazzanti CM, Spanevello RM, Pereira LB, Gonçalves JF, Kaizer R, Corrêa M, Ahmed M, Mazzanti A, Festugatto R, Graça DL, Morsch VM, Schetinger MR (2006) Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. *Neurochem Res* 31:1027-1034
28. Mazzanti CM, Spanevello R, Ahmed M, Schmatz R, Mazzanti A, Salbego FZ, Graça DL, Sallis ES, Morsch VM, Schetinger MR (2007) Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Int J Dev Neurosci* 25:259-264
29. Mazzanti CM, Spanevello R, Ahmed M, Pereira LB, Gonçalves JF, Corrêa M, Schmatz R, Stefanello N, Leal DB, Mazzanti A, Ramos AT, Martins TB, Danesi CC, Graça DL, Morsch VM, Schetinger MR (2009) Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. *Int J Dev Neurosci* 27:73-80
30. Spanevello RM, Mazzanti CM, Kaizer R, Zanin R, Cargnelutti D, Hannel L, Côrrea M, Mazzanti A, Festugatto R, Graça D, Schetinger MR, Morsch VM (2006) 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* 31:455-462
31. Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R, Bagatini M, Stefanello N, Correa M, Kaizer R, Maldonado P, Mazzanti A, Graça DL, Martins TB, Danesi C, Morsch VM, Schetinger MR (2009) Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. *Brain Res Bull* 80:45-51
32. Spanevello RM, Mazzanti CM, Schmatz R, Thomé G, Bagatini M, Correa M, Rosa C, Stefanello N, Bellé LP, Moretto MB, Oliveira L, Morsch VM, Schetinger MR (2010) The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Chim Acta* 411:210-214
33. Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, Thomé G, Morsch VM, Becker L, Bellé L, de Oliveira L, Schetinger MR (2010)

Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol* 257:24-30

34. 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

35. Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:77-89

36. Jaques JA, Peres Rezer JF, Ruchel JB, Gutierrez J, Bairros AV, Gomes Farias IL, Almeida da Luz SC, Mello Bertoncheli Cd, Chitolina Schetinger MR, Morsch VM, Leal DB (2011) A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. *Anal Biochem* 410:34-39

37. Bergmeyer HU (1983) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Deerfield Beach

38. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95

39. Fitzgerald BB, Costa LG (1993) Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* 20:210-216

40. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P (1999) Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 288:73-90

41. Rocha JB, Emanuelli T, Pereira ME (1999) Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 53:431-437
42. Guisti G, Galanti B (1984) Colorimetric method. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp 315-323
43. Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G (1980) Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 199:345-354
44. 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
45. Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H (2006) The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 27:1-7
46. Brück W (2005) Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol* 252:10-15
47. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT (2007) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31:77-98
48. Cieślak M, Komoszyński M (2011) [The role of ecto-purines in inflammation leading to demyelination - new means for therapies against multiple sclerosis]. *Neurol Neurochir Pol* 45:489-499
49. Thomé GR, Oliveira LS, Schetinger MR, Morsch VM, Spanevello RM, Fiorenza AM, Seres J, Baldissarelli J, Stefanello N, Pereira ME, Calgaroto NS, Pimentel VC, Leal DB, Souza V do C, Jaques JA, Leal CA, Cruz RC, Thiesen FV, Melazzo Mazzanti C (2012) Nicotine alters the ectonucleotidases activities in lymphocytes: In vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother* 66:206-212

50. Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ, Kawashima K, Grando SA (2007) The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39:125-135
51. Nakatsuji Y, Nakano M, Moriya M, Kishigami H, Tatsumi C, Tada S, Sadahiro S, Naka T, Mitani K, Funauuchi M, Azuma T, Watanabe S, Kinoshita M, Kajiyama K, Yuasa Y, Kaido M, Takahashi MP, Naba I, Hazama T, Sakoda S (2006) Beneficial effect of interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis is associated with transient increase in serum IL-6 level in response to interferon-beta injection. *Cytokine* 36:69-74
52. Ramagopalan SV, Byrnes JK, Orton SM, Dyment DA, Guimond C, Yee IM, Ebers GC, Sadovnick AD (2010) Sex ratio of multiple sclerosis and clinical phenotype. *Eur J Neurol* 17:634-637
53. Giovannoni G, Miller DH, Losseff NA, Sailer M, Lewellyn-Smith N, Thompson AJ, Thompson EJ (2001) Serum inflammatory markers and clinical/MRI markers of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 248:487-495
54. Kremenchutzky M, Rice GP, Baskerville J, Wingerchuk DM, Ebers GC (2006) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain* 129:584-594
55. Kim SH, Huh SY, Kim W, Park MS, Ahn SW, Cho JY, Kim BJ, Kim HJ (2013) Clinical characteristics and outcome of multiple sclerosis in Korea: does multiple sclerosis in Korea really differ from that in the Caucasian populations? *Mult Scler*. doi: 10.1177/1352458513477712
56. Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K (2008) Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci* 106:186-192
57. Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F (2002) Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 132:147-155

58. Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* 74:675-696
59. Kawashima K, Fujii T (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86:29-48
60. Battisti V, Schetinger MR, Maders LD, Santos KF, Bagatini MD, Correa MC, Spanevello RM, do Carmo Araújo M, Morsch VM (2009) Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Chim Acta* 402:114-118
61. Zanini D, Schmatz R, Pelinson LP, Pimentel VC, da Costa P, Cardoso AM, Martins CC, Schetinger CC, Baldissareli J, do Carmo Araújo M, Oliveira L, Chiesa J, Morsch VM, Leal DB, Schetinger MR (2013) Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. *Mol Cell Biochem* 374:137-148
62. Mack A, Robitzki A (2000) The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog Neurobiol* 60:607-628
63. Layer PG, Sporns O (1987) Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:284-288
64. Ofek K, Soreq H (2013) Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chem Biol Interact* 203:113-9
65. Porcel J, Montalban X (2006) Anticholinesterasics in the treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 245:177-181
66. Nizri E, Hamra-Amitay Y, Sicsic C, Lavon I, Brenner T (2006) Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 50:540-547
67. van Westerloo DJ (2010) The vagal immune reflex: a blessing from above. *Wien Med Wochenschr* 160:112-117

68. Cerejeira J, Nogueira V, Luís P, Vaz-Serra A, Mukaetova-Ladinska EB (2012) The cholinergic system and inflammation: common pathways in delirium pathophysiology. *J Am Geriatr Soc* 60:669-675
69. Karimabad MN, Arababadi MK, Hakimizadeh E, Daredori HY, Nazari M, Hassanshahi G, Kennedy D (2013) Is the IL-10 promoter polymorphism at position-592 associated with immune system-related diseases? *Inflammation* 36:35-41
70. Bansi J, Bloch W, Gamper U, Kesselring J (2013) 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* 19:613-621
71. Killestein J, Den Drijver BF, Van der Graaff WL, Uitdehaag BM, Polman CH, Van Lier RA (2001) Intracellular cytokine profile in T-cell subsets of multiple sclerosis patients: different features in primary progressive disease. *Mult Scler* 7:145-150
72. Alatab S, Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Khosrofar M, Mokhtari F (2011) Cytokine profile, Foxp3 and nuclear factor-kB ligand levels in multiple sclerosis subtypes. *Minerva Med* 102:461-468
73. Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP Jr, Halper J, Likosky WH, Lublin FD, Silberberg DH, Stuart WH, van den Noort S (2002) Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 58:169-178
74. Goldberg LD, Edwards NC, Fincher C, Doan QV, Al-Sabbagh A, Meletiche DM (2009) Comparing the cost-effectiveness of disease-modifying drugs for the first-line treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Manag Care Pharm* 15:543-555
75. Romeo M, Martinelli-Boneschi F, Rodegher M, Esposito F, Martinelli V, Comi G (2013) Clinical and MRI predictors of response to interferon-beta and glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 20:1060-1067

76. Pratibha K, Anand U, Agarwal R (2004) Serum adenosine deaminase, 5' nucleotidase and malondialdehyde in acute infective hepatitis. *Indian J Clin Biochem* 19:128-131
77. Dos Santos Jaques JA, Becker LV, Souza Vdo C, Leal CA, Bertoldo TM, de Vargas Pinheiro K, Morsch VM, Schetinger MR, Leal DB (2013) Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 31:395-399
78. Loza MJ, Anderson AS, O'Rourke KS, Wood J, Khan IU (2011) T-cell specific defect in expression of the NTPDase CD39 as a biomarker for lupus. *Cell Immunol* 271:110-117
79. Becker LV, Rosa CS, Souza Vdo C, Bagatini MD, Casali EA, Leal CA, da Silva JC, Moretto MB, Pinheiro Fde V, Morsch VM, Schetinger MR, Leal DB (2010) Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 43:1096-1100
80. Bagatini MD, Martins CC, Gasparetto D, Spanevello RM, Becker LV, Rosa CS, Battisti V, Bellé L, Gonçalves JF, Schetinger MR, Dos Santos RB, Oliveira LZ, Morsch VM (2011) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chim Acta* 412:159-164
81. Maldonado PA, Pimentel VC, Negrini LA, Morsch VM, Schetinger MR (2012) Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer. *Biomed Pharmacother* 66:6-11
82. Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA (2003) Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 170:2962-2970
83. Souza Vdo C, Schlemmer KB, Noal CB, Jaques JA, Zimmermann CE, Leal CA, Fleck J, Casali EA, Morsch VM, Schetinger MR, Leal DB (2012) E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. *Parasitol Int* 61:690-696

LEGENDS OF FIGURES

Fig. 1 AChE activity in lymphocytes of healthy subjects and MS patients. Bars represent means \pm SEM. *Represents statistical difference from the control group (Student's t test, * $P < 0.05$ n = 29).

Fig. 2 AChE activity in whole blood of healthy subjects and MS patients. Bars represent means \pm SEM. *Represents statistical difference from the control group (Student's t test, * $P < 0.05$ n = 29).

Fig. 3 BChE activity in serum of healthy subjects and MS patients. Bars represent means \pm SEM. *Represents statistical difference from the control group (Student's t test, * $P < 0.05$ n = 29).

Fig. 4 ADA activity in serum of healthy subjects and MS patients. Bars represent means \pm SEM. ***Represents statistical difference from the control group (Student's t test, *** $P < 0.0001$ n = 21).

Fig. 5 Cytokines levels in serum of healthy subjects and MS patients. Bars represent means \pm SEM. *Indicates statistical difference from the control group (Student's t test, * $P < 0.05$ n = 29) and ***represents statistical difference from the control group (Student's t test, *** $P < 0.0001$ n = 29).

Fig. 6 C-reactive protein (CRP) levels in serum of healthy subjects and MS patients. Bars represent means \pm SEM. *Indicates statistical difference from the control group (Student's t test, * $P < 0.05$ n = 29).

Figures

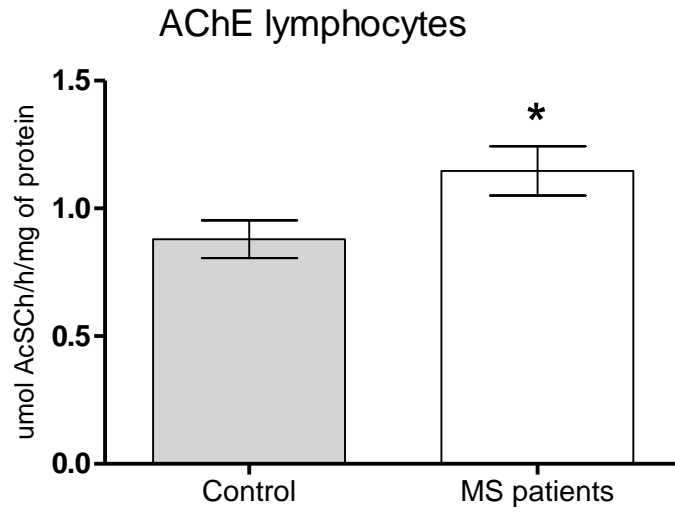


Fig. 1

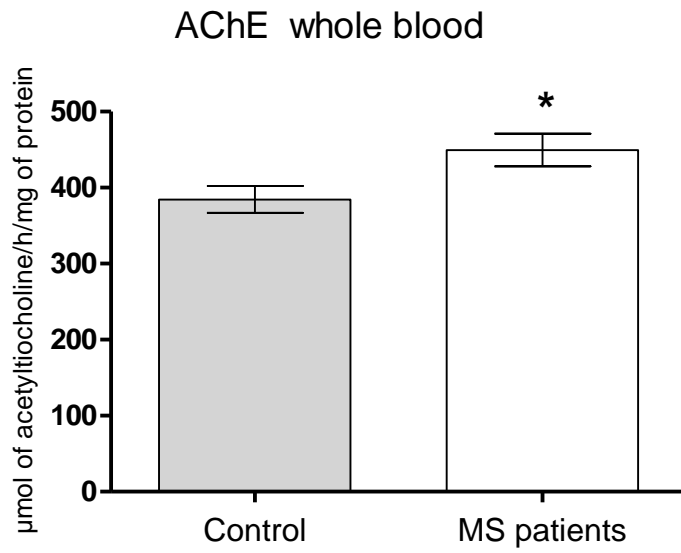


Fig. 2

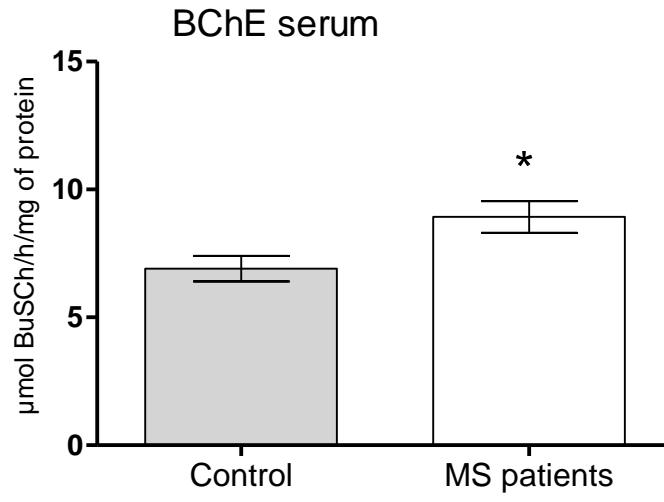


Fig. 3

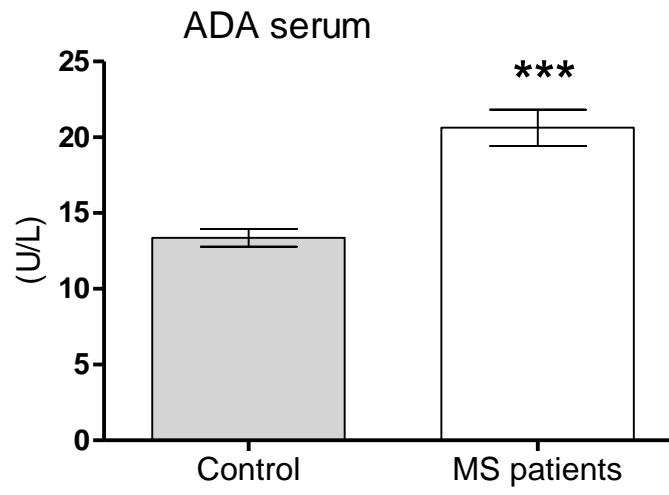
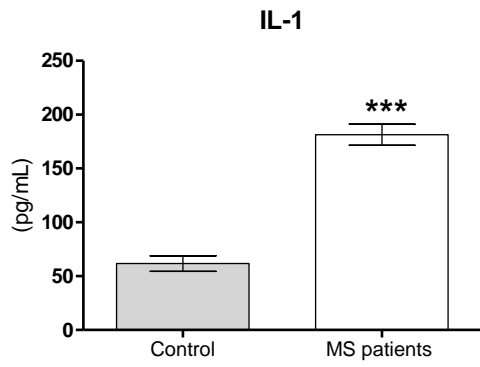
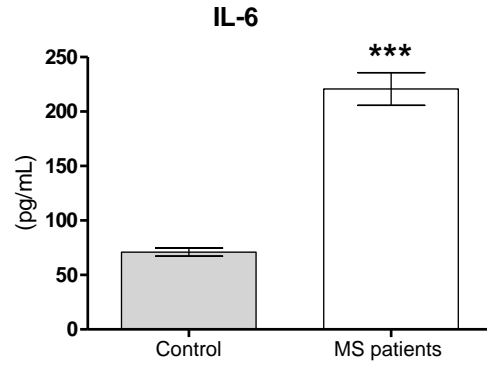


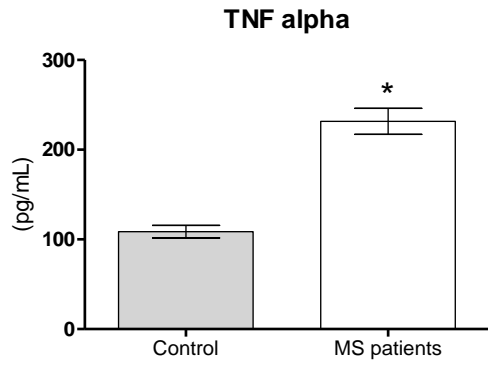
Fig. 4



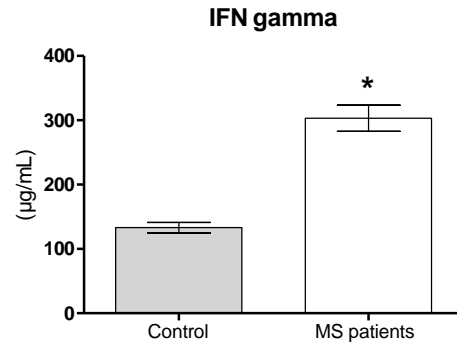
a



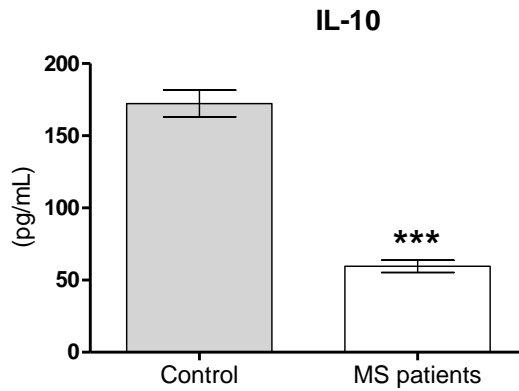
b



c



d



e

Fig. 5

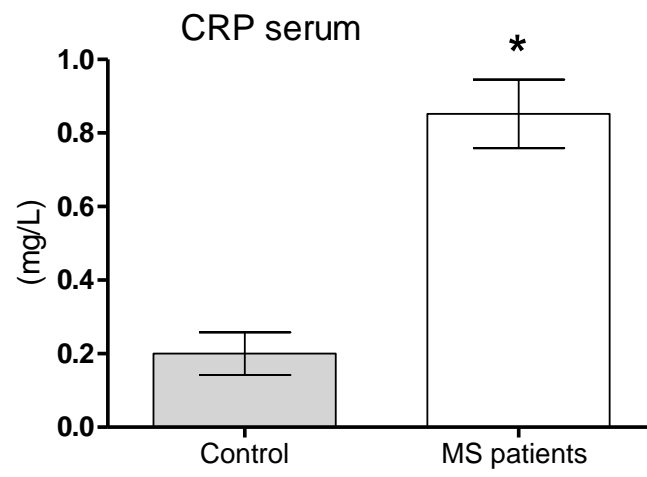


Fig. 6

Tables

Table 1 – General characteristics of MS patients and healthy subjects.

	Control	MS patients
N	29	29
Women	20	19
Men	9	10
Age women (median,range)	38.7±2.8, 22-58	41.2 ±2.8, 18-60
Age men (median,range)	36.4 ±3.9, 23-52	39.5 ±4.3, 13-58
Disease duration (years)	-	9.65 ±1.7
Use of glatiramer acetate (n)	-	16
Use of interferon β (n)	-	8

Variables such as age and duration of disease are presented as mean±SEM.

Table 2- Purine levels in serum of healthy subjects and MS patients analyzed by high pressure liquid chromatography (HPLC). Results are expressed in nmol/ml of serum (n= 8-10). Data are represented as mean±SEM. (ATP= adenosine triphosphate, ADP=adenosine diphosphate, AMP=adenosine monophosphate, Ado=adenosine, Ino=inosine, Hyp=hypoxantine and Uric acid). *Represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P<0.05$).

	ATP	ADP	AMP	Ado	Ino	Hyp	Uric acid
Control group	7.26±1.05	2.61±0.54	2.29±0.56	9.86±0.97	2.36±0.36	3.27±0.56	30.66±2.32
MS patients	4.51±0.62*	4.39±0.88*	3.50±0.70*	14.04±1.4*	4.30±0.85*	3.30±0.66	32.68±7.91

4 CONCLUSÕES

- ✓ A atividade da AChE em linfócitos e sangue total, bem como, a atividade da BChE em soro apresentaram-se aumentadas em pacientes com esclerose múltipla quando comparadas aos controles. Assim, sugere-se que a ACh pode ser degradada mais rapidamente e por conseguinte, seus níveis plasmáticos diminuem. Sabendo-se que a ACh apresenta propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias, o aumento na atividade das colinesterases poderia contribuir para as alterações imunológicas e inflamatórias observadas em pacientes com EM.
- ✓ A atividade da ADA em soro de pacientes com esclerose múltipla foi significativamente aumentada em relação aos controles. Sugere-se que a adenosina produzida pela hidrólise dos nucleotídeos de adenina seja rapidamente consumida pela ADA, não exercendo, dessa maneira, seus efeitos anti-inflamatórios em pacientes com esclerose múltipla.
- ✓ Os marcadores inflamatórios como a IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral alfa, interferon gama e proteína C-reativa no soro encontraram-se elevados em pacientes com EM, entretanto, a IL-10 estava diminuída nesta mesma população quando comparada aos sujeitos saudáveis. Com base nestes resultados é plausível sugerir que pacientes com a forma remitente-recorrente de esclerose múltipla apresentam um aumento dos biomarcadores inflamatórios, que poderá levar ao desenvolvimento de novos surtos com aumento dos comprometimentos gerados por esta doença.
- ✓ Os níveis de ADP, AMP, adenosina e inosina mostraram-se aumentados em soro de pacientes com EM, enquanto que os níveis de ATP apresentaram-se reduzidos nesse grupo em relação aos indivíduos controles. Esses resultados sugerem que os efeitos pró-inflamatórios gerados pelo ATP no meio extracelular podem estar diminuídos nos portadores de EM e, ainda o aumento nos níveis de adenosina

podem estar atuando como uma resposta compensatória do organismo as alterações inflamatórias e imunes que os pacientes com EM apresentam. Considerando-se que a adenosina possui propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras. Em relação aos níveis de hipoxantina e ácido úrico no soro, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo de pacientes e o grupo controle indicando que os níveis dessas purinas não seriam alterados por essa condição patológica.

- ✓ Em conjunto esses resultados são muito importantes do ponto de vista clínico porque sugerem que pacientes com esclerose múltipla, mesmo em uma fase de remissão, apresentam uma alteração inflamatória sistêmica. Além disso, é plausível sugerir que portadores dessa doença possuem importantes alterações, na atividade de enzimas regulatórias dos sistemas colinérgico e purinérgico, podendo os parâmetros mencionados neste estudo serem úteis para o desenvolvimento de novas terapias que venham a auxiliar no tratamento dessa patologia.

REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19-29, jan. 2009.

AIRAS, L.; NIEMELÄ, J.; JALKANEN, S. CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. **Journal of immunology**, v. 165, n. 10, p. 5411-7, nov. 2000.

AKTAS, O.; WAICZIES, S.; ZIPPI, F. Neurodegeneration in autoimmune demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, n. (1-2), p.17-26, mar. 2007.

ALDRICH, M. B.; BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R. E. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 272, n. 2, p. 311-5, jun. 2000.

ANDREASYAN, N. A. et al. ADA2 isoform of adenosine deaminase from pleural fluid. **FEBS Letters**, v. 579, n. 3, p. 643-7, jan. 2005.

ANDREWS, T.; ZHANG, P.; BHAT, N. R. TNF alpha potentiates IFNgamma-induced cell death in oligodendrocyte progenitors. **Journal of neuroscience research**, v. 54, n. 5, p. 574-83, dez. 1998.

ANGLISTER, L. et al. Cholinesterases in development and disease. **Chemical-biological interactions**, v. 175, n. 1-3, p. 92-100, set. 2008.

ANWAR, J. et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenosine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. **Food and chemical toxicology**, v. 56, p. 459-66, jun. 2013.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood cells, molecules & disease**, v. 36, n. 2, p. 17-22, abr. 2006.

BAGATINI, M. D. et al. Enzymes that hydrolyze adenosine nucleotides in patients with ischemic heart disease. **Clinica chimica acta**, v. 412, n. (1-2), p. 159-64, jan. 2011.

- BANWELL, B. et al. Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. **Lancet neurology**, v. 6, n. 10, p. 887-902, out. 2007.
- BARCELLOS, L. F. et al. Clustering of autoimmune diseases in families with a high-risk for multiple sclerosis: a descriptive study. **Lancet neurology**, v. 5, n. 11, p. 924-31, nov. 2006.
- 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. 452-61, abr. 2010.
- BATTISTI, V. et al. Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clinica chimica acta**, v. 402, n. (1-2), p. 114-8, abr. 2009.
- 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.
- BEGOLKA, W. S. et al. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. **Journal of immunology**, v. 161, n. 8, p. 4437-46, out. 1998.
- BEN-ZACHARIA, A. B. Therapeutics for Multiple Sclerosis Symptoms. **The Mount Sinai journal of medicine**, v. 78, n. 2, p. 176–91, mar-abr. 2011.
- BIANCHI, V.; SPYCHALA, J. Mammalian 5'-nucleotidases. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46195-8, nov. 2003.
- BIELEKOVA, B.; MARTIN, R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. **Brain**, n. 127, n. (Pt 7), p. 1463-78, jul. 2004.
- BJARTMAR, C.; WUJEK, R.; TRAPP, B. D. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. **Journal of neurological sciences**. v. 206, n. 2, p.165-171, fev. 2003.
- 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.

BRENNER, T. et al. Acetylcholinesterase inhibitors and cholinergic modulation in Myasthenia Gravis and neuroinflammation. **Journal of neuroimmunology**, v. 201-202, p. 121-7, set. 2008.

BRUCK, W. Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 252, n. 5, p. 10-15, nov. 2005.

BUC, M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, [DOI: 10.1155/2013/963748], mai. 2013.

BUTTMANN, M.; KAVERI, S.; HARTUNG, H. P. Polyclonal immunoglobulin G for autoimmune demyelinating nervous system disorders. **Trends in pharmacological sciences**. [DOI: 10.1016/j.tips.2013.05.009], jun. 2013.

CALLEGARO, D. Diagnóstico e Tratamento da Esclerose Múltipla. Esclerose Múltipla. **Projeto Diretrizes (Academia Brasileira de Neurologia)**, p. 1-10, jul. 2001.

CAPPELLANO, G. et al. Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. **American journal of neurodegenerative disease**, v. 2, n. 2, p. 89-107, jun. 2013.

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. 727-30, set. 2006.

CARNEVALE, D.; DE SIMONE, R.; MINGHETTI, L. Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 6, n. 6, p. 388-97, dez. 2007.

CASTRO, F.; BRIBIÁN, A.; ORTEGA, M. C. Regulation of oligodendrocyte precursor migration during development, in adulthood and in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [DOI 10.1007/s00018-013-1365-6], mai. 2013.

CAVAZZANA-CALVO, M. et al. Is normal hematopoiesis maintained solely by long-term multipotent stem cells? **Blood**, v. 117, n. 17, p. 4420-4, abr. 2011.

CHRISTENSEN, L. D.; ANDERSEN, V.; RYDER, L. Decreased Number of CD73 (ecto-5'-Nucleotidase) Molecules on Lymphocytes from Patients with Primary

Immunoglobulin Deficiencies. Correlation between Number of CD73 Molecules and T-Lymphocyte Function *In Vitro*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 44, n. 1, p. 62-70, jul. 1996.

CIEŚLAK, M.; KOMOSZYŃSKI, M. [The role of ecto-purines in inflammation leading to demyelination - new means for therapies against multiple sclerosis]. **Neurologia i neurochirurgia polska**, v. 45, n. 5, p. 489-99, set-out. 2011.

COLGAN, S. P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic signalling**, v. 2, n. 2, p. 351-60, jun. 2006.

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

COMPSTON, A. The pathogenesis and basis for treatment in multiple sclerosis. **Clinical neurology and neurosurgery**, v. 106, n. 3, p. 246-8, jun. 2004.

COMPSTON, A.; COLES, A. **Multiple sclerosis**. *Lancet*, v. 372, n. 9648, p. 1502-17, out. 2008.

CONFAVREUX, C. et al. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. **The new England journal of medicine**, v. 343, n. 20, p. 1430-8, nov. 2000.

CORREALE, J.; FAREZ, M.F. Does helminth activation of toll-like receptors modulate immune response in multiple sclerosis patients? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. 112, ago. 2012.

CORREALE, J.; MELI, F.; YSRRAELIT, C. [Neuronal injury in multiple sclerosis]. **Medicina**. v. 66, n. 5, p. 472-85, 2006.

CORREALE, J.; VILLA, A. Cellular elements of the blood-brain barrier. **Neurochemical research**, v. 34, n. 12, p. 2067-77, dez. 2009.

COSTA, C.C.R. et al. O adoecimento do portador de esclerose múltipla: percepções e vivências a partir da narrativa de dois casos clínicos. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 18, n. 3, p. 117-24, set. 2005.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 131-8, fev. 2003.

DARVESH, S. et al. Butyrylcholinesterase activity in multiple sclerosis neuropathology. **Chemico-biological interactions**, v. 187, n. 1, p. 425-31, 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.

Das, U. N. Is multiple sclerosis a proresolution deficiency disorder? **Nutrition**, v. 28, n. 10, p. 951-8, out. 2012.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immunosuppression. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257-65, jun. 2007.

DeBOLT, L. S.; McCUBBIN, J. A. The effects of home-based resistance exercise on balance, power, and mobility in adults with multiple sclerosis. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 85, n. 2, p. 290-7, fev. 2004.

Di VIRGILIO, F. et al. Leukocyte P2 receptors: a novel target for anti-inflammatory and anti-tumor therapy. **Current drug targets Cardiovascular & haematological disorders**, v. 5, n. 1, p. 85-99, fev. 2005.

DOBSON, R.; GIOVANNONI, G.; RAMAGOPALAN, S. The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 84, n. 4, p. 427-32, abr. 2013.

Dos SANTOS JAQUES, J. A. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Cell biochemistry and function**, v. 31, n. 5, p. 395-9, jul. 2013.

DUTTA, R.; TRAPP, B. D. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. **Progress in neurobiology**, v. 93, n. 1, p. 1-12, jan. 2011.

ELLIS, T.; MOTL, R. W. Physical activity behavior change in persons with neurologic disorders: overview and examples from Parkinson disease and multiple sclerosis. **Journal of neurologic physical therapy**, v. 37, n. 2, p. 85-90, jun. 2013.

FERNÁNDEZ, V. et al. Recommendations for the clinical use of motor evoked potentials in multiple sclerosis. **Neurologia**, [DOI:pii:S0213-4853(12)00247-2], set. 2012.

FERREIRA, C. C. V. et al. Differences in the progression of primary progressive multiple sclerosis in Brazilians of African descent versus white Brazilian patients. **Multiple sclerosis**, v. 16, n. 5, p. 597-603, mai. 2010.

FERREIRA, M. L. B. et al. Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 62, n. 4, p. 1027-32, dez. 2004.

FILIPPI, M.; ROCCA, M. A. Multiple sclerosis: new measures to monitor the disease. **Lancet neurology**, v. 12, n. 1, p. 12-3, jan. 2013.

FILLATREAU, S. et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. **Nature immunology**, v. 3, n. 10, p. 944-50, out. 2002.

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.

FRANCIOTTA, D. et al. B cells and multiple sclerosis. **Lancet neurology**, v. 7, n. 9, p. 852-8, set. 2008.

FRANCO, R. et al. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. **Critical reviews in immunology**, v. 27, n. 6, p. 495-509, 2007.

FRICKE, I. et al. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. **Journal of immunology**, v. 176, n. 9, p. 5173-82, mai. 2006.

FRISCHER, J. M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Brain**, v. 132, n. (Pt 5), p. 1175-89, mai. 2009.

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.

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.

GESSI, S. et al. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic signalling**, v. 3, n. (1-2), p. 109-16, mar. 2007.

GEURTS, J. J.; BARKHOF, F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. **Lancet neurology**, v. 7, n. 9, p. 841-51, set. 2008.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological research**, v. 50, n. 4, p. 433-40, out. 2004.

GILBOA-GEFFEN, A.; HARTMANN, G.; SOREQ, H. Stressing hematopoiesis and immunity: an acetylcholinesterase window into nervous and immune system interactions. **Frontiers in molecular neuroscience**, p. 5-30, mar. 2012.

GIOVANNONI, G. et al. Soluble E-selectin in multiple sclerosis: raised concentrations in patients with primary progressive disease. **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, v. 60, n. 1, p. 20-6, jan. 1996.

HASSAN-SMITH, G.; DOUGLAS, M.R. Epidemiology and diagnosis of multiple sclerosis. **British journal of hospital medicine**, v. 72, n. 10, p. (M146-51), out. 2011.

HENRIKSEN, K.N.; SORENSEN, P.S. Why does the north–south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the Northern hemisphere? **Journal of the Neurological Sciences**, v. 311, n. (1-2), p. 58-63, dez. 2011.

HOCHMEISTER, S. et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 65, n. 9, p. 855-65, set. 2006.

HOHNOKI, K.; INOUE, A.; KOH, C.S. Elevated serum levels of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha/unelevated serum levels of IL-10 in patients with demyelinating diseases during the acute stage. **Journal of neuroimmunology**, v. 87, n. (1-2), p. 27-32, jul. 1998.

HON, G. et al. Immune cell membrane fatty acids and inflammatory marker, C-reactive protein, in patients with multiple sclerosis. **The British journal of Nutrition**, v. 102, n. 9, p. 1334-40, nov. 2009.

HON, G.M. et al. Peripheral blood mononuclear cell membrane fluidity and disease outcome in patients with multiple sclerosis. **Indian journal of hematology & blood transfusion**, v. 28, n. 1, p. 1-6, mar. 2012.

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. **Faseb journal**, v. 24, n. 4, p. 1023-34, abr. 2010.

JAQUES, J. A. et al. The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. **Cell biochemistry and function**, v. 29, n. 8, p. 703-7, dez. 2011.

JOKANOVIĆ, M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. **Toxicology letters**, v. 190, n. 2, p. 107-15, out. 2009.

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.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201-12, mar. 2011.

JUNKER, A. et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. **Brain**, v. 130, n. (Pt 11), p. 2789-99, 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.

KALLAUR, A.P. et al. Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. **Molecular medicine reports**, v. 7, n. 3, p. 1010-20, mar. 2013.

KANNAN, S. E-NTPase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation. **Medical hypotheses**, v. 58, n. 6, p. 527-8, jun. 2002.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. **Frontiers in bioscience**, v. 9, p. 2063-85, 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. 2101-9, mar. 2003a.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life sciences**, v. 74, n. 6, p. 675-96, dez. 2003b.

KES, V. B. et al. Quality of life in patients with multiple sclerosis. **Acta clinica Croatica**, v. 52, n. 1, p. 107-11, mar. 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.

KIMURA, R. et al. Nicotine-induced Ca^{2+} signaling and down-regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the CEM human leukemic T-cell line. **Life sciences**, v. 72, n. (18-19), p. 2155-8, mar. 2003.

KIPP, M.; STAR, B.; VOGEL, D. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 1, n. 1, p. 15-28, jan. 2012.

KOLLIAS, G. et al. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. **Annals of the rheumatic disease**, v. 58, n. 1, p. 32-9, nov. 1999.

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.

KURTZKE, J. F. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. **Journal of neurovirology**, v. 6, n. 2, p. 134-40, mai. 2000.

LANE, R. M.; POTKIN, S.; ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. The **international journal of neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 101-24, fev. 2006.

LASSMANN, H. Mechanisms of multiple sclerosis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 2, n. 4, p. 447-52, nov. 2005.

LEAL, D. B. et al. NTPDase activity in human lymphocytes is not affected by therapeutic doses of anti-HIV drugs. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 65, n. 8, p. 594-6, dez, 2011.

LUBLIN, F. D.; BAIER, M.; CUTTER, G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 61, n. 11, p. 1528-32, dez. 2003.

LUCAS-MEUNIER, E. et al. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 446, n. 1, p. 17-29, abr. 2003.

MAJUMDER, P. et al. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 4, p. 317-31, set. 2007.

MALDONADO, P. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 400-6, abr. 2008.

MALONI, H. W. Multiple sclerosis: managing patients in primary care. **The Nurse practitioner**, v. 38, n. 4, p. 24-35, abr. 2013.

MARRERO, M. B. et al. Application of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists in inflammatory diseases: an overview. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 2, p. 413-6, fev. 2011.

MARRIE, R.A. Demographic, genetic, and environmental factors that modify disease course. **Neurologic clinics**, v. 29, n. 2, p. 323-41, mai. 2011.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31-91, jul. 1993.

MATSUSHITA, T. et al. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. **PLoS one**. v. 8, n. 4, p. (e61835), abr. 2013.

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. 1027-34, ago. 2006.

McGRAW, C. A.; LUBLIN, F. D. Interferon beta and glatiramer acetate therapy. **Neurotherapeutics**, v. 10, n. 1, p. 2-18, jan. 2013.

MILO, R.; KAHANA, E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 5, p. (A387-94), mar. 2010.

MINGUETTI, G. Ressonância Magnética na Esclerose Múltipla, análise de 270 casos. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 59, n. (3-A), p. 563-69, set. 2001.

MIRANDOLA, S.R. et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. **International immunopharmacology**, v. 9, n. (7-8), p. 824-30, jul. 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. 358-65, abr. 2002.

MOHYEDDIN BONAB, M. et al. Evaluation of Cytokines in Multiple Sclerosis Patients Treated with Mesenchymal Stem Cells. **Archives of medical research**, v. 44, n. 4, p. 266-72, mai. 2013.

MOLINA-HOLGADO, E. et al. LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: Role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. **The Europe journal of neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 493-502, fev. 2001.

MOREIRA, M.A. et al. Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento de Esclerose Múltipla: as evidências para o uso de glicocorticoides e imunomoduladores. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 60, n. (3-B), p. 875-80, set. 2002.

MOREIRA, M. A. et al. Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. **Revista de neurologia**, v. 34, n. 4, p. 379-83, fev. 2002.

MUKHERJEE, P. K. et al. Lead finding for acetylcholinesterase inhibitors from natural origin: structure activity relationship and scope. **Mini reviews in medical chemistry**, v. 11, n. 3, p. 247-62, mar. 2011.

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.

NESS, J. M. et al. Clinical features of children and adolescents with multiple sclerosis. **Neurology**, v. 68, n. 16(Suppl 2), p. (S37-45), abr. 2007.

NIEDZWICKI, J. G.; ABERNETHY, D. R. Structure-activity relationship of ligands of human plasma adenosine deaminase 2. **Biochemical pharmacology**, v. 41, n. 11, p. 1615-24, jun.1991.

NIZRI, E. et al. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 540-7, abr. 2006.

NOSEWORTHY, J. H. et al. Multiple sclerosis. **The New England journal of medicine**, v. 343, n. 13, p. 938-52, set. 2000.

OLIVEIRA, P. et al. Cell-specific regulation of acetylcholinesterase expression under inflammatory conditions. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v.51, n. 2, p. 129-37, jan. 2012.

PACHECO, R. et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, v. 102, n. 27, p. 9583-8, jul. 2005.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, behavior, and immunity**, v. 19, n. 6, p. 493-9, nov. 2005.

PEIREIRA, L. A.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; DERTKIGIL, M. S.; GRAÇA, D. L. Biology of the repair of central nervous system demyelinated lesions: an appraisal. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 54, n. 2, p. 331-4, jun.1996.

PETERMANN, F.; KORN, T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. **FEBS letters**, v. 585, n. 23, p. 3747-57, dez. 2011.

PIMENTEL, V. C. et al. Evaluation of acetylcholinesterase and adenosine deaminase activities in brain and erythrocytes and proinflammatory cytokine levels in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia model. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 378, n. (1-2), p. 247-55, jun. 2013.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 155, n. 3, p. 219-29, set. 2011.

POHL, D. et al. Treatment of pediatric multiple sclerosis and variants. **Neurology**, v. 68, n. 16(Suppl 2), p. (S54-65), abr. 2007.

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- 81, jun. 2006.

POURSHARIFI, P. et al. Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 and ADA2 activities. **Clinical biochemistry**, v. 42, n. (13-14), p.1438-43, set. 2009.

RAO, A. A.; SRIDHAR, G. R.; Das, U. N. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Medical hypotheses**, v. 69, n. 6, p. 1272-6, 2007.

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. 334-40, dez. 2004.

REYNOLDS, R. et al. The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. **Acta neuropathologica**, v. 122, n. 2, p. 155-70, ago. 2011.

RIBEIRO, S.B. et al. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 69, n. (2A), p. 184-7, abr. 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. 409-30, jun. 2006.

ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Interleukin 1 in the brain: Biology, pathology and therapeutic target. **Trends in neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 618-25, dez. 2000.

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.

SARI, R. A. et al. Correlation of serum levels of adenosine deaminase activity and its isoenzymes with disease activity in rheumatoid arthritis. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 21, n. 1, p. 87-90, jan. 2003.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n.1, p. 48-56, jan. 2005.

SAUER, A. V. et al. Alterations in the adenosine metabolism and CD39/CD73 adenosinergic machinery cause loss of Treg cell function and autoimmunity in ADA-deficient SCID. **Blood**, v. 119, n. 6, p. 1428-39, fev. 2012.

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, 2007.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin. **Life sciences**, v. 84, n. (11-12), p. 345-50, mar. 2009.

SCHÖNROCK, L. M.; GAWLOWSKI, G.; BRÜCK, W. Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions. **Neuroscience letters**, v. 294, n. 1, p. 45-8, nov. 2000.

SCHREMPF, W.; ZIEMSEN, T. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. **Autoimmunity reviews**, v. 6, n. 7, p. 469-75, ago. 2007.

SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 635-73, 1994.

SEIFFERT, K. et al. ATPgammaS enhances the production of inflammatory mediators by a human dermal endothelial cell line via purinergic receptor signaling. **The Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 5, p. 1017-27, mai. 2006.

SEIXAS, D. et al. [Pain in multiple sclerosis: characterization of a Portuguese population of 85 patients]. **Acta Medica Portuguesa**, v. 22, n. 3, p. 233-40, jun. 2009.

SELLNER, J.; GREEVE, I.; MATTLE, H. P. Atorvastatin decreases high-sensitivity C-reactive protein in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 14, n. 7, p. 981-4, ago. 2008.

SHAROYAN, S. et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 539-46, ago. 2006.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current opinion in pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293-302, jun. 2005.

SOILU-HÄNNINEN, M. et al. High sensitivity measurement of CRP and disease progression in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 65, n. 1, p. 153-5, jul. 2005.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, abr. 2001.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 683-747, 2005.

SOTGIU, S. et al. Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis. **Neurobiology of disease**, v. 17, n. 2, p. 131-43, nov. 2004.

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.

SPANEVELLO, R. M. et al. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clinica chimica acta**, v. 411, n. (3-4), p. 210-4, fev. 2010b.

STÜVE, O.; OKSENBERG, J. Multiple Sclerosis Overview. **GeneReviews™ [Internet]**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013, mai. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1316/>>. Acesso em 12 jul. 2013.

TAYEBATI, S. K. et al. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of neuroimmunology**, v. 132, n. (1-2), p. 147-55, nov. 2002.

THOMÉ, G. R. et al., Nicotine alters the ectonucleotidases activities in lymphocytes: In vitro and in vivo studies. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 66, n. 3, p. 206-12, abr. 2012.

TISCHNER, D.; REICHARDT, H. M. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 275, n. (1-2), p. 62-70, set. 2007.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of clinical Investigation**, v. 117, n. 2, p. 289-96, fev. 2007.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 6, p. 418-28, jun. 2009.

TRAPP, B. D.; NAVE, K. A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? **Annual review of neuroscience**, v. 31, p. 247-69, 2008.

TRAUTMANN, A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". **Science Signaling**, v. 2, n. 56, p: (pe6), fev. 2009.

TROJANO, M. et al. Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. **PLoS one**, v. 7, n. 10, p. (e48078), 2012.

TYAGI, E. et al. Inhibitory role of cholinergic system mediated via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in LPS-induced neuro-inflammation. **Innate immunity**, v. 16, n. 1, p. 3-13, fev. 2010.

UNGERER, J. P. et al. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. **Clinical chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1322-6, jul. 1992.

VAN HORSSSEN, J. et al. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1812, n. 2, p. 141-50, fev. 2011.

VELA, J. M. et al. Interleukin-1 regulates proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. **Molecular and cellular neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 489-502, jul. 2002.

WAKERLEY, B.; NICHOLAS, R.; MALIK, O. Multiple sclerosis. **Medicine**, v. 36, n. 12, p. 625-9, dez. 2008.

WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384-8, jan. 2003.

WEISSERT, R. The Immune Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 857-66, mai. 2013.

WILLER, C. J. et al. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 330, n. 7483, p. 120, jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Atlas: multiple sclerosis resources in the world 2008**. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/neurology/Atlas_MS_WEB.pdf>. Acesso em 20 jun. 2013.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-94, mai. 2008.

Yu, C. et al. Neuroinflammation activates Mdr1b efflux transport through NFkappaB: promoter analysis in BBB endothelia. **Cellular physiology and biochemistry**, v. 22, n. (5-6), p. 745-56, dez. 2008.

ZANINI, D. et al. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 374, n. (1-2), p. 137-48, fev. 2013.

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. 279-90, ago. 2010.

Zhu, J. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of substituted 2-aminobenzimidazoles as novel inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Bioorganic & medical chemistry**, v. 21, n. 14, p. 4218-24, jul. 2013.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. (1-2), p. 44-56, mai. 2001.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic signalling**, v. 8, n. 3, p. 437-502, set. 2012.

ZIVADINOV, R. et al. Effect of intravenous methylprednisolone on the number, size and confluence of plaques in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Journal of the neurological sciences**, v. 267, n. (1-2), p. 28-35, abr. 2008.