

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica – Núcleo de Neurociências (NNC)

Bárbara Fernandes Pinto

Avaliação da resposta anti-inflamatória da Angiotensina 1-7 associada a lipossomas administrada por via inalatória em camundongos com encefalomielite autoimune experimental

Belo Horizonte - MG
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica – Núcleo de Neurociências (NNC)

Bárbara Fernandes Pinto

Avaliação da resposta anti-inflamatória da Angiotensina 1-7 associada a lipossomas administrada por via inalatória em camundongos com encefalomielite autoimune experimental

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, ICB – UFMG, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Fisiologia.

Orientação: Prof^a. Dr^a Juliana Carvalho Tavares

Belo Horizonte – MG
2018

**"AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NEUROINFLAMATÓRIA DA
ANGIOTENSINA 1-7 ASSOCIADA A LIPOSSOMAS
ADMINISTRADA POR VIA INALATÓRIA EM CAMUNDONGOS
COM ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL"**

BARBARA FERNANDES PINTO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **31 de agosto de 2018**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA - ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. ALINE SILVA DE MIRANDA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA - ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. JULIANA CARVALHO TAVARES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2018.

*A minha mãe Eliana por seu amor incondicional, ao meu querido pai
Heraldo pelo apoio e ao amore della mia vita pelo companheirismo*

AGRADECIMENTOS

Agradecer as pessoas que são importantes em nossas vidas é o mínimo que podemos fazer, pois não somos nada sem o apoio de quem amamos.

Primeiramente agradeço a Deus pela força e coragem durante toda esta longa caminhada. Obrigada a Ti Senhor por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Em especial agradeço a minha querida mãe Eliana, pelo incentivo e encorajamento para que eu nunca desistisse dos meus sonhos. Te agradeço mãe por todo o companheirismo e por seu amor incondicional. Te amo muito.

Ao meu pai Heraldo, pela compreensão, apoio e contribuição na minha formação acadêmica. Obrigada pai por ser o meu maior herói. Te amo.

A minha avó Horandina pelo apoio e a minha querida avó Clores (*in memoriam*) que sempre acreditou no meu potencial e sempre esteve em meu coração. Gostaria muito que estivesse aqui nesse momento tão maravilhoso e vitorioso em minha vida. Saudades eternas!

A minhas irmãs Bruna e Ana Carolina por todo o carinho e incentivo. Agradeço muito a vocês por todas as vezes que tiveram a meu lado, apoiando-me e tranquilizando-me em todos os momentos difíceis dessa jornada. Hoje, com vocês quero compartilhar essa etapa tão especial da minha vida.

Ao meu grande amor Flaron pela paciência, carinho e companheirismo em todos os momentos. Agradeço por sempre acreditar no meu potencial e por ter se tornado meu porto seguro. Te amo eternamente.

À minha orientadora Juliana, primeiramente por ter me concedido a honra de ser sua aluna de mestrado. Agradeço pelo apoio incondicional prestado, a forma interessada e extraordinária como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas

construtivas, discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo este percurso. Obrigada pela confiança no meu trabalho, pelo respeito, por me ensinar, pela compreensão e pelos sábios conselhos. Você foi mais que uma orientadora, foi e sempre será uma eterna amiga. A você a minha enorme gratidão!

A professora Maria da Glória, que foi a percussora neste meu mundo acadêmico. Saiba que você foi a responsável por plantar em mim a sementinha da “curiosidade científica”. Obrigada pelas conversas, companheirismo e apoio. Espelho muito em você a mulher que um dia quero me tornar. Muito obrigada.

Aos professores do Núcleo de Neurociências, André, Bruno, Cleiton, Grace e Márcio pelas ricas contribuições no decorrer deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus colaboradores, professor Frezard, professor Robson e Doutora Maura por toda a contribuição e incentivo. A vocês minha eterna gratidão.

A turma do Núcleo de Neurociências, obrigada por tonar os meus dias mais alegres e por ter me proporcionado momentos agradáveis e inesquecíveis. Agradeço muito a Deus por ter conhecido cada um de vocês.

Ao Mestre Guilherme por ter contribuído para o preparo dos lipossomas e a Mariana por ter me cedido prontamente os peptídeos. Muito obrigada.

Ao Mestre Mostafa por ter realizado comigo muitos dos meus experimentos. Muito obrigada!

A minha querida sogra Denise que sempre me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos. Agradeço os conselhos e as palavras de carinho.

A minha amiga Mariana por sempre estar presente em minha vida em todos os momentos. Obrigada Mari.

A minha amiga Lorena que tornou o meu primeiro ano do mestrado em um período muito alegre. Muito obrigada pelos ensinamentos, risadas, conversas e conselhos. Saiba que você foi essencial na minha formação acadêmica.

Aos meus queridos Leonardo Silva, Leonardo Teotônio, Letícia, Andreia e Lorena por terem sido as melhores companhias nesse tempo de convivência. Sinto muito a falta de vocês.

A Universidade Federal de Minas Gerais, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a realização desse sonho, contribuindo para a minha formação acadêmica.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização dessa conquista. O meu muito obrigada!

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, crônica e progressiva caracterizada por infiltrado inflamatório, gliose, desmielinização e degeneração neuroaxonal no sistema nervoso central. Embora a doença apresente caráter irreversível e progressivo, diversas formas de tratamento têm sido utilizadas com o objetivo de minimizar os sintomas clínicos da EM. No entanto, muitos desses medicamentos são de alto custo e apresentam sérios efeitos adversos, diminuindo a adesão dos pacientes ao tratamento e em alguns casos podendo ser fatais. Sendo assim, é relevante e necessário avaliar novas vias e estratégias terapêuticas para o tratamento da EM. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta neuroinflamatória em camundongos com encefalomielite autoimune experimental (EAE) nebulizados com lipossomas contendo Angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)]. O modelo de EAE foi induzido em camundongos C57Bl/6J, fêmeas, selvagens (WT), com 8 a 12 semanas de idade, através da administração subcutânea de emulsão contendo MOG 35-55, Mycobacterium tuberculosis e adjuvante completo de Freund (CFA). Animais do grupo controle (saudáveis), e os animais EAE, foram nebulizados a cada 72 horas, com salina, ou com lipossomas vazios, ou com Ang-(1-7), ou com lipossomas contendo Ang-(1-7), ao longo de 20 dias. O peso corporal e às manifestações clínicas foram avaliados. Com relação aos parâmetros inflamatórios, no 20º dia pós indução avaliou-se a permeabilidade vascular do cérebro, medula espinhal, pulmão e baço; e a concentração das interleucinas IL-10, TNF- α , IL-1 β e IL-6 no tecido cerebral e medular. Além disso, foi quantificada, por microscopia intravital a interação leucócito-endotélio na microvasculatura da medula espinhal, e por H&E as alterações histopatológicas medulares. O grupo tratado com lipossomas contendo Ang-(1-7) apresentou melhor escore clínico, menor perda de peso, redução da permeabilidade vascular cerebral, pulmonar e da concentração de IL-6 cerebral. Por microscopia intravital, observou-se que houve um aumento do rolamento leucocitário na microvasculatura medula. Em conclusão, pela primeira vez demonstrou-se que animais com encefalomielite autoimune experimental apresentaram uma melhora clínica e inflamatória após a nebulização de lipossomas contendo Ang-(1-7), demonstrando assim o importante papel neuroinflamatório da Ang-(1-7), quando associada a lipossomas e administrada por via nasal.

Palavras-chaves: encefalomielite autoimune experimental; Angiotensina 1-7, infiltração leucocitária; nebulização; lipossomas; neuroinflamação.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, progressive and autoimmune disease characterized by inflammatory infiltrates, gliosis, demyelination and neuroaxonal degeneration in the central nervous system. Although the disease is irreversible and progressive, several forms of treatment have been used to minimize the clinical effects of MS. However, many of these drugs used for MS treatment are expensive and have serious side effects, decreasing patients' adherence to treatment and in some cases being lethal. Therefore, it is relevant and necessary to evaluate new pathways and treatment therapeutic options strategies for treatment of multiple sclerosis. The objective of this study was to evaluate the neuroinflammatory response in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) nebulized with liposomes containing Angiotensin 1-7 [Ang-(1-7)]. The EAE model was induced in C57Bl/6 wild-type (WT) mice, aged 8-12 weeks, by subcutaneous administration of emulsion containing MOG 35-55, Mycobacterium tuberculosis and complete Freund's adjuvant (CFA). Animals of the Control (healthy) group, and EAE animals, were nebulized every 72 hours, either with saline, Ang-(1-7), or with empty liposomes, or with Ang-(1-7) containing encapsulated into liposomes, over 20 days. Body weight and clinical manifestations were evaluated. Regarding the inflammatory parameters, on the 20th day after induction the brain, spinal cord, lung and spleen vascular permeability of the brain, spinal cord, lung and spleen was evaluated, as well as and the concentration of interleukins IL-10, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in brain and spinal cord homogenates tissue. In addition, the leukocyte-endothelium interaction in the spinal cord microvasculature was quantified by intravital microscopy, and spinal cord histopathological changes by H&E staining the spinal histopathological changes were quantified. The group treated with liposomes containing Ang-(1-7) presented lower clinical score, lower weight loss, reduced cerebral vascular, pulmonary permeability, and cerebral IL-6 concentration. By intravital microscopy, it was observed that there was an increase of the medullar leukocyte bearing rolling in the microvasculature medulla. In conclusion, for the first time showed that, animals with experimental autoimmune encephalomyelitis showed presented a improvement of clinical signs and inflammatory improvement response after the nebulization of liposomes containing Ang-(1-7). Altogether, our results suggest a, thus demonstrating the important neuroprotective role of Ang-(1-7) when associated with liposomes and administered nasally by inhalation.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis; Angiotensin 1-7, inhalation leukocyte infiltration; liposomes; neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resposta autoimune evidenciada na EM.....	22
Figura 2: Visão esquemática e atualizada do Sistema Renina-Angiotensina.....	34
Figura 3: Representação esquemática da via direta e indireta da administração nasal de fármacos.....	38
Figura 4: Representação esquemática do delineamento experimental.....	46
Figura 5: Representação do processo de nebulização.....	46
Figura 6: Fotografias demonstrativas da microscopia intravital.....	51
Figura 7: Análise da evolução clínica dos animais.....	58
Figura 8: Análise correlação entre o escore clínico e o peso corporal relativo.....	60
Figura 9: Análise da permeabilidade vascular do cérebro, medula espinhal, pulmão e baço por quantificação por espectrometria da concentração de Azul de Evans extravasado para o parênquima tecidual.....	62
Figura 10: Análise da interação leucócito endotélio na microvasculatura medular.....	63
Figura 11: Imagens representativas do recrutamento leucocitário visualizado por microscopia intravital.....	64
Figura 12: Análise da concentração das citocinas inflamatórias no cérebro e medula espinhal através do ELISA.....	66
Figura 13: Análise do processo inflamatório medular pela técnica de H&E.....	67

Figura 14: Fotomicrografias da medula espinhal dos grupos experimentais.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais fármacos utilizados para o tratamento da EM, suas respectivas vias de administração e principais efeitos colaterais.....	32
Tabela 2: Distribuição dos grupos experimentais.....	45
Tabela 3: Escore clínico.....	49
Tabela 4: Diferenças estatísticas dos pesos corporais entre os grupos doentes e controles.....	57
Tabela 5: Valores estatísticos das correlações entre peso e escore clínico.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Akt** – Proteína quinase B
- ALT** – Alanina transaminase
- AMPK** – Proteína quinase dependente de AMP
- Ang I** – Angiotensina I
- Ang II** – Angiotensina II
- Ang-(1-7)** – Angiotensina 1-7
- ANOVA** – Análise de variância
- AT1** – Receptor da angiotensina do tipo 1
- AT2** – Receptor da angiotensina do tipo 2
- BDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BHE** – Barreira hematoencefálica
- BSA** – Albumina de soro bovino
- CD** – Grupamento de diferenciação
- CEBIO** – Centro de Bioterismo
- CETEA** – Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CFA** – Adjuvante Completo de Freund
- CHO** – Colesterol
- CREB** – Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
- DA** – Doença de Alzheimer
- DMF** – Dimetil fumarato
- DP** – Doença de Parkinson
- DSPC** – Diestearoil-fosfatidilcolina
- DSPE-PEG2000** – Diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietileno glicol 2000
- EAE** – Encefalomielite autoimune experimental
- EBV** – Vírus de Epstein-Barr
- ECA** – Enzima conversora de angiotensina
- ECA 2** – Enzima conversora de angiotensina 2
- EM** – Esclerose múltipla
- EMSR** – Esclerose múltipla surto remissiva
- ERK1/2** – Cinase 1/2 regulada por sinal extracelular
- FCE** – Fluido cérebro espinal
- FDA** - Administração de Alimentos e Drogas

g – Grama
GWAS – Estudos de associação genômica ampla
H&E – Hematoxilina-eosina
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
HCAR2 – Ácido hidrocarboxílico 2
HLA – Antígenos Leucocitários Humanos
i.p. – Intraperitoneal
i.v. – Intravenosa
icv – Intracerebroventricular
IFN-γ – Interferon gama
IL – Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
JNK – Quinase N-terminal c-Jun
Kg – Quilograma
L – Litros
LCR – Líquido cefalorraquidiano
LPS – Lipopolissacarídeos
M – Molar
MCAO – Oclusão da artéria cerebral média
mg – Miligrama
mg/Kg – Miligrama por quilograma
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
Min – Minutos
mL – Mililitro
mm – Milímetros
MMF – Monometil fumarato
MOG – Glicoproteína da mielina de oligodendrócito
MPB – Proteína básica da mielina
mRNA – RNA mensageiro
MSIF – Federação Internacional de Esclerose Múltipla
NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NF-κB – Fator nuclear κB
ng – Nanograma
NK – Quinase N-terminal c-Jun

nm – Nanômetro
NNC – Núcleo de Neurociências
NO – Óxido nítrico
Nrf2 – Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
°C – Graus celsius
OPD – Dicloridrato de o-fenilenodiamina
p38 MAPK – Proteína-quinase ativada por mitógeno
PA – Pressão arterial
PBM – Proteína básica da mielina
PBS – Tampão fosfato salina
PDI – Índice de Polidispersão
pg – Picograma
pH – Potencial hidrogeniônico
PI3K – Fosfoinositídeo 3-quinase
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsufonila
PTX – Toxina *Pertussis*
RE1F – Receptor de esfingosina-1-fosfato
RM – Ressonância magnética
RNA – Ácido ribonucleico
RNS – Espécies reativas de nitrogênio
ROS – Espécie reativa de oxigênio
rpm – Rotações por minuto
s – Segundos
s.c. – Subcutâneo
SIRT – Sirtuína
SNC – Sistema nervoso central
SNPs – *Single-nucleotide polymorphisms*
SRA – Sistema renina angiotensina
TGF-B – Fator de crescimento tumoral beta
Th1 – Linfócito T *auxiliar* do tipo 1
Th17 – Linfócito T *auxiliar* do tipo 17
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
Treg – Linfócito T regulador
VJC – Vírus John Cunningham.

μg – Micrograma

μl – Microlitro

μm – Micrômetro

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 Esclerose Múltipla.....	20
1.1.1 Conceito e aspectos imunopatológicos.....	20
1.1.2 Causas e aspectos epidemiológicos	23
1.1.3 Manifestações clínicas	24
1.1.4 Diagnóstico	24
1.1.5 Tratamentos e vias de administração dos fármacos.....	25
1.1.5.1 Interferon beta.....	26
1.1.5.2 Acetato de glatirâmer.....	26
1.1.5.3 Teriflunomida	27
1.1.5.4 Fingolimoide	28
1.1.5.5 Natalizumab	28
1.1.5.6 Alemtuzumab	29
1.1.5.7 Mitoxantrona.....	29
1.1.5.8 Daclizumab.....	30
1.1.5.9 Dimetil fumarato (DMF)	30
1.2 Modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental.....	33
1.3 Sistema Renina-Angiotensina	33
1.4 Receptor Mas e suas funcionalidades.....	36
1.5 Via nasal de administração de fármacos	37
1.6 Nanocarreadores como sistemas de <i>delivery</i> de drogas	38
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos específicos.....	43

4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Animais e delineamento experimental.....	45
4.2 Indução do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)	47
4.3 Preparo dos Lipossomas	47
4.4 Avaliação da evolução clínica do EAE	48
4.5 Avaliação da permeabilidade vascular	49
4.6 Microscopia intravital na microvasculadura medular	50
4.7 ELISA.....	51
4.8 Avaliação das alterações Histológicas	52
4.8.1 Hematoxilina e Eosina (H&E)	53
4.8.2 Quantificação das imagens.....	53
4.9 Análises Estatísticas.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1 Escore clínico e peso corporal.....	56
5.2 Atributos físico-químicos dos lipossomas	59
5.3 Escore clínico <i>versus</i> Peso corporal.....	59
5.4 Avaliação da permeabilidade vascular do cérebro, medula, pulmão e baço.....	61
5.5 Avaliação da adesão e rolamento leucocitário na microvasculatura medular .	62
5.6 Avaliação da concentração de citocinas no cérebro e medula espinhal	65
5.7 Avaliação do infiltrado inflamatório medular	67
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Esclerose Múltipla

1.1.1 Conceito e aspectos imunopatológicos

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica, progressiva e autoimune caracterizada por infiltrado inflamatório, gliose, desmielinização e degeneração neuroaxonal no sistema nervoso central (SNC) (DENDROU *et al.*, 2015; MÄURER *et al.* & NURO-GYINA *et al.*, 2016). Essa desordem é capaz de afetar o cérebro, a medula espinhal e os nervos óticos (ORTIZ *et al.*, 2014), sendo considerada a causa mais comum de incapacidade neurológica de origem não traumática (LIEBNER *et al.*, 2018).

O timo é um órgão linfoide primário bastante especializado, sendo responsável pelo estabelecimento da tolerância central através da deleção de células T autorreativas. Entretanto, esse processo nem sempre ocorre de maneira eficiente, ocasionando na liberação de células T autorreativas para a periferia. Normalmente, os mecanismos de tolerância periférica mantêm essas células sob controle. No entanto, defeitos na função das células T reguladoras (Treg) e/ou aumento da resistência de células B efectoras e de células T aos mecanismos de supressão, podem quebrar essa tolerância periférica (DENDROU *et al.*, 2015). Desta forma, linfócitos B e T autorreativos presentes na periferia podem tornar-se ativados através de diversos processos, como o mimetismo molecular, na qual um peptídeo de um antígeno estranho que se assemelha a uma parte de uma proteína própria do organismo é apresentado a uma célula T, desencadeando uma resposta autoimune (MILJKOVIC & SPASOJEVIC, 2013; DENDROU *et al.*, 2015).

A associação de fatores genéticos e ambientais, incluindo agentes infecciosos e constituintes do cigarro, contribui para a ativação dessas células autorreativas. Assim, células T autorreativas se diferenciam em células T helper 1 (Th1) e células T helper 17 (Th17). Juntamente a essas células, células B, células da imunidade inata e grande quantidade de linfócitos T citotóxicos migram para o SNC ocasionando inflamação e dano tecidual (HERNÁNDEZ-PEDRO *et al.*, 2013; DENDROU *et al.*, 2015). Além disso, a micróglia torna-se ativada liberando citocinas pró-inflamatórias e moléculas relacionadas ao estresse oxidativo, proporcionando a neurodegeneração e alteração da transmissão sináptica. (PARODI, 2015).

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira de difusão essencial para o funcionamento normal do CNS, e fundamental para preservar a homeostase do CNS. Ela constitui uma interface que restringe o transporte desordenado de células e substâncias da circulação sanguínea para dentro do parênquima neural, sendo considerada um importante componente da unidade neurovascular (SWEENEY, SAGARE & ZLOKOVIC, 2018; DOPKINS *et al.*, 2018). Esta estrutura é formada pelas proteínas de junção das células endoteliais, pericitos e astrócitos (TSOU *et al.*, 2017; LIEBNER *et al.*, 2018) e é capaz de permitir o transporte de moléculas selecionadas, tais como, oxigênio, gás carbônico e glicose, por meio de proteínas transportadoras (TSOU *et al.*, 2017). Na EM a ativação da micróglia, o infiltrado de macrófagos e a atividade mitocondrial proporcionam o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio no SNC, causando o início de lesões ao longo da BHE (DOPKINS *et al.*, 2018). Dessa forma, na EM há aumento da permeabilidade da BHE (CRAMER *et al.*, 2015), levando à migração de células imunológicas (macrófagos, células dendríticas, células T, células B e micróglia) e secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas associadas à inflamação, óxido nítrico e metaloproteinases, que culmina na formação de placas escleróticas (lesões) desmielinização e neurodegeneração (DARGAHI *et al.*, 2017; PODBIELSKA *et al.*, 2018). Na EM também ocorre o aumento do número de células T helper foliculares e da ativação dos linfócitos B (AL-KHAMIS, 2016).

A cascata pró-inflamatória, que contribui para patogenia da EM e da encefalomielite autoimune experimental (EAE), é desencadeada tanto por células da imunidade inata quanto da adaptativa e envolve a produção e liberação de diversas citocinas inflamatórias como IL-1 β pelos macrófagos e monócitos, IL-6 pelos linfócitos B, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelos macrófagos, IL-17, pelas células Th17, interferon gama (IFN- γ) pelas células Th1 e *natural killer*, dentre outras citocinas que participam desta resposta autoimune. Por sua vez, a concentração da interleucina IL-10, liberada principalmente por células Treg, apresenta-se reduzida em pacientes com EM (PALLE *et al.*, 2017; LEHMANN-HORN *et al.*, 2017). Estudo realizado por BETTELLI e colaboradores (1998) demonstrou que camundongos knockout para IL-10 são mais susceptíveis ao desenvolvimento da EAE, além de adquirirem maior severidade da doença, quando comparados com animais selvagens (WT).

Dessa forma, a migração de células inflamatórias para o SNC consiste em uma importante etapa para o desenvolvimento da EM (DENDROU *et al.*, 2015). Ao entrar em contato com a parede do vaso sanguíneo apoiada por vários mecanismos de adesão, os leucócitos transmigram através da barreira endotelial e da membrana basal subjacente em um processo denominado diapedese (SAMUS *et al.*, 2018). O recrutamento leucocitário evidenciado na EM, envolve o rolamento, adesão e a transmigração celular, desencadeando o processo inflamatório no SNC (BERNARDES *et al.*, 2013). Primeiramente, a fase aguda da doença é caracterizada por infiltrado de células imunes mononucleadas como linfócitos, monócitos e macrófagos no SNC. Com o avançar da doença, pode-se evidenciar desmielinização irreversível, cicatriz astrogliótica e perda axonal e neuronal (HAMMER *et al.*, 2017). (Figura 1).

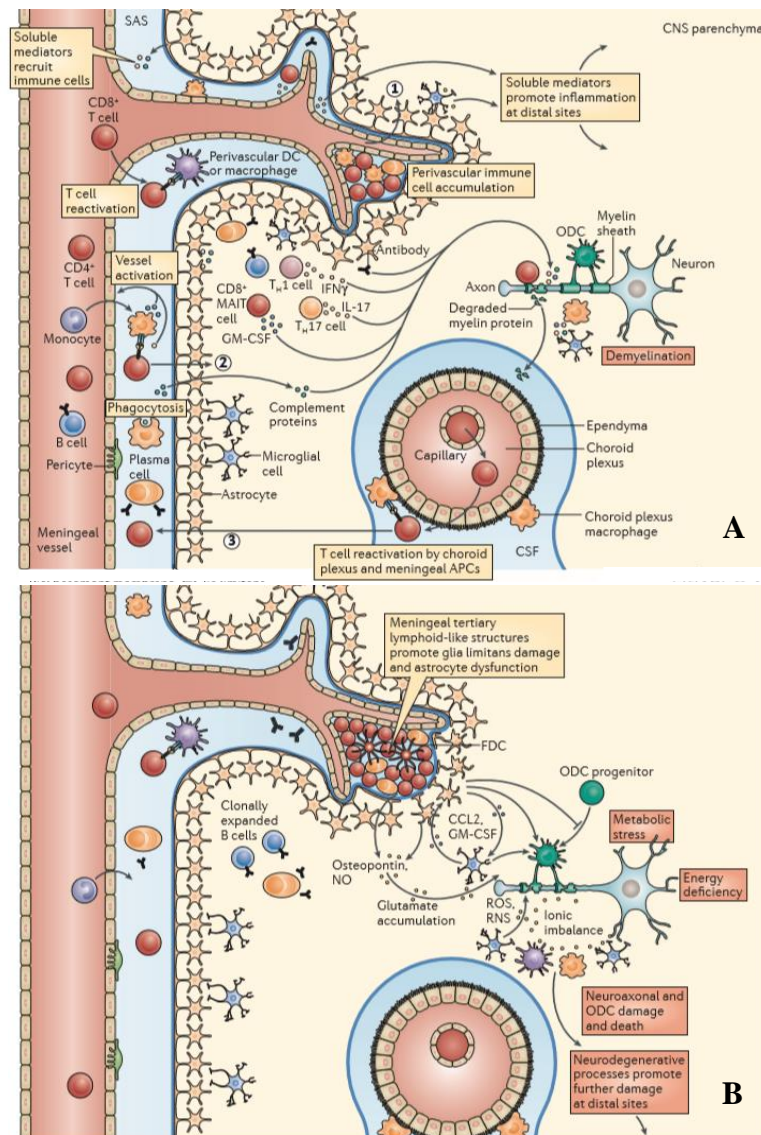


Figura 1: Resposta autoimune evidenciada na EM. (A) Resposta inflamatória observada na fase inicial e na (B) fase tardia da doença (DENDROU, *et al.*, 2015).

1.1.2 Causas e aspectos epidemiológicos

A EM é a mais comum doença crônica desmielinizante (TILLERY *et al.*, 2018), afetando preferencialmente pessoas com idades entre 20 e 40 anos. Sua incidência é 2-3 vezes maior nas mulheres (POSSA *et al.*, 2017), sendo mais frequente em mulheres brancas, especialmente as descendentes do norte da Europa (TILLERY *et al.*, 2018). Entretanto a EM pode afetar crianças, correspondendo a menos de 1% dos casos, e pessoas acima de 50 anos de idade, representando entre 2 a 10% (GHASEMI *et al.*, 2017).

A prevalência da EM é bastante heterogênea havendo maior incidência na América do Norte (140/100.000 habitantes) e Europa (108/100.000 habitantes). Segundo a Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF) a prevalência média global da doença aumentou de 30/100.000 em 2008 para 33/100.000 em 2013 (LERAY *et al.*, 2015). No Brasil, a maior incidência de EM foi observada na região sul (27,2/100.000 habitantes), ao modo que, a menor incidência foi registrada na região nordeste (1,36/100.000 habitantes) (PEREIRA *et al.*, 2015)

A causa específica da EM é ainda desconhecida, entretanto alguns fatores genéticos, ambientais e imunológicos têm apresentado correlação com a etiologia da doença. Fatores ambientais, incluindo exposição a agentes virais e bacterianos como o vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da herpes humano do tipo 6 e pneumonia por micoplasma, assim como o tabagismo, a deficiência de vitamina D e a exposição à radiação UV podem predispor o desenvolvimento da doença (MILO R & MILLER, 2014; GHASEMI *et al.*, 2017). Esses agentes estranhos podem apresentar um antígeno estruturalmente homólogo com os componentes da bainha de mielina desencadeando em ataque a bainha de mielina quando o sistema imunológico é ativado por esses patógenos. O tabagismo por sua vez, aumenta a produção de óxido nítrico (NO), que em concentrações patológicas, pode danificar neurônios e oligodendrócitos (GHASEMI *et al.*, 2017).

Os estudos de associação genômica ampla (GWAS) identificaram mais de 100 locus gênicos que predispõem o de risco adquirir EM. A maioria desses locus regulam ou codificam genes que controlam as funções das células imunes (PALLE *et al.*, 2017). Os primeiros estudos explorando marcadores genéticos de doenças autoimunes identificaram o locus do antígeno leucocitário humano (HLA), como um locus crítico ligado à susceptibilidade a doenças autoimunes, como a EM (YADAV *et al.*, 2015).

1.1.3 Manifestações clínicas

Dependendo da área acometida, a EM pode ocasionar diversos sinais e sintomas. Assim, as manifestações clínicas podem variar entre os pacientes, sendo que as mais comuns são perda sensorial, déficits motores, sintomas autonômicos e cerebelares, neurite ótica, alterações na cognição e depressão (MILJKOVIC, 2013; POSSA *et al.*, 2017). A medida que o processo de desmielinização progride, os sintomas se agravam, pois, o impulso nervoso não consegue ser propagado adequadamente nos neurônios desmielinizados (TILLERY *et al.*, 2018).

A EM apresenta quatro diferentes fenótipos: primariamente progressiva, secundariamente progressiva, progressiva com surtos e surto remissiva (EMSR). A forma surto remissiva é a mais comum, afetando 80% dos pacientes (KUEHL *et al.*, 2017). Os sintomas aparecem periodicamente sendo caracterizado por períodos de surto, na qual o paciente vivencia os sintomas, e por período de remissão, sendo os sintomas pouco perceptíveis. Com o avanço da doença a progressão dos surtos torna-se mais evidente (THATI *et al.*, 2015). A forma primariamente progressiva envolve aproximadamente 10% dos pacientes com EM (DOLATI, *et al.*, 2017), sendo que a deterioração neurológica está presente desde o início da doença, ocasionando em acúmulo gradual de incapacidade (CONSTANTINESCU *et al.*, 2011; ONTANEDA & FOX, 2015). Os sintomas preferivelmente ocorrem devido a lesões da medula espinhal, ao ponto que o cérebro tende a ter menor incidência lesional (GHASEMI *et al.*, 2017). O subtipo secundariamente progressiva ocorre após um curso recidivante inicial da doença, sendo que cerca de 65% dos pacientes com EMSR evoluem para esta forma clínica (ONTANEDA & FOX, 2015). A forma progressiva com surtos é considerada a menos comum, correspondendo a apenas 5% dos casos de EM (GHASEMI *et al.*, 2017), sendo bastante semelhante a primariamente progressiva, entretanto, apresenta recidivas sobrepostas (DARGAHI *et al.*, 2017).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da EM é principalmente clínico, entretanto a ressonância magnética (RM), a avaliação do fluido cérebro espinhal (FCE) e a análise dos potenciais evocados tanto visuais quanto sensitivos podem auxiliar na detecção da doença (DARGAHI *et al.*, 2017). Através da análise do FCE pode-se verificar a

presença de bandas oligoclonais e o aumento da concentração de imunoglobulinas. Os potenciais evocados avaliados por estudos eletrofisiológicos fornecem informações referentes a lentificação da condutibilidade nervosa, demonstrando a existência de desmielinização axonal. Por sua vez, as lesões no SNC podem ser constatadas por meio de análise das imagens obtidas pela RM (MILO & MILLER, 2014).

A comprovação precisa da doença sempre requer cuidadosa exclusão de outras patologias que poderiam explicar melhor os achados clínicos, radiológicos e laboratoriais (MILLERETAL, 2008). Assim, testes sanguíneos são usualmente utilizados para auxiliar na exclusão de outras doenças que mimetizam a EM (MILO & MILLER, 2014).

Os critérios de McDonald têm demonstrado precisão, objetividade e precocidade para a confirmação da EM. Os critérios firmados por McDonald em 2017 avaliam o diagnóstico da doença através da disseminação temporal e espacial (SAND, 2015). A disseminação espacial refere-se a presença de uma ou mais lesões em no mínimo duas áreas do SNC, como nas regiões periventricular, justacortical, infratentorial e/ou na medula espinhal. A disseminação temporal refere-se ao desenvolvimento das lesões ao longo do tempo na qual deve constatar uma nova lesão observada pela RM (MCNICHOLAS *et al.*, 2018). Até o presente momento não existe um biomarcador específico para diagnosticar a EM, entretanto, em estudo realizado em modelos de EAE demonstrou que o glicano pode atuar com um possível potencial biomarcador para inflamação autoimune (DELLAVALLE *et al.*, 2018).

1.1.5 Tratamentos e vias de administração dos fármacos

A EM é caracterizada como uma doença progressiva, neurodegenerativa, incapacitante e irreversível, não apresentando cura. Entretanto, diversas formas de tratamento têm surgido e sido utilizadas com o objetivo de minimizar os efeitos da doença (TILLERY *et al.*, 2018). Atualmente os principais fármacos utilizados no tratamento da EM são interferon beta, acetato de glatiramer, teriflunomida, fingolimode, natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrona e o dimetil fumarato (DMF), sendo que todos esses fármacos apresentam características anti-inflamatórias (TORKILDSEN *et al.*, 2016). No entanto, muitos desses medicamentos apresentam sérios efeitos adversos, podendo ser fatais (GAJOFATTO & TURATTI, 2018; ZHAO

et al., 2018). Além disso, os tratamentos atuais são caros, podendo apresentar formas desagradáveis de administração. Considerando o exposto, fica explícita a necessidade de avaliar novas opções de tratamento mais eficazes e seguras (GLANZ *et al.*, 2014; SCOLDING *et al.*, 2017; DELLAVALLE *et al.*, 2018). (Tabela 1).

1.1.5.1 Interferon beta

O Interferon beta foi aprovado em 2014 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento das formas recorrentes da EM. Acredita-se que o mecanismo de ação deste fármaco ocorra pela sua capacidade em inibir as células Th17, reduzir a proliferação de linfócitos T, apresentação de antígeno e a produção de citocinas pró-inflamatórias, induzir a apoptose de células T autorreativas, alterar a expressão de citocinas e metaloproteinases da matriz e restaurar a função supressora. Entretanto este fármaco requer regimes de administração incômodos: até três injeções semanais (LA MANTIA *et al.*, 2014; BIOTTI & CIRON, 2018; TILLERY *et al.*, 2018).

Os principais efeitos adversos associados ao uso deste medicamento incluem síndrome gripal, reações locais pós injeção (vermelhidão, hematomas, abscessos, trombozes). Outros efeitos colaterais observados são complicações hepáticas, doença renal, linfopenia, e leucopenia, microangiopatias trombóticas, complicações imunológicas e neuropatias periféricas (BIOTTI & CIRON, 2018). Outro fator que desfavorece a terapia com o interferon beta é o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, os quais anulam o efeito do fármaco. A probabilidade do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes aumenta com o aumento da dose e frequência da administração, limitando as doses terapêuticas (TABANSKY *et al.*, 2015).

1.1.5.2 Acetato de glatirâmer

O Acetato de glatiramer foi inicialmente aprovado pelo FDA em 1996 com o intuito de reduzir a frequência de surtos em pacientes com a forma EMSR. Acredita-se que o fármaco é capaz de induzir e ativar as células supressoras de linfócitos T, reduzir a liberação do fator neurotrófico e inibir as células T autorreativas específicas

para mielina (BIOTTI & CIRON, 2018). Assim como o interferon beta, sua forma de administração é subcutânea (TILLERY *et al.*, 2018).

As desvantagens do uso acetato do medicamento incluem reações imediatas pós-injeção (rubor, dor torácica, palpitações, ansiedade, dispnéia, constrição na garganta e/ou urticária) que pode ocorrer vários meses após o início, embora seja geralmente transitória e autolimitada. Pode ocorrer lipoatrofia e necrose da pele, sendo de extrema importância instruir os pacientes sobre a técnica adequada de injeção do fármaco (TABANSKY *et al.*, 2015; TILLERY *et al.*, 2018). Outros efeitos adversos associados ao longo tempo de uso deste fármaco são infecções urinária e do trato respiratório superior, insônia, parestesia e dor (AURICCHIO *et al.*, 2017).

1.1.5.3 Teriflunomida

O teriflunomida foi aprovado, em 2012, pelo FDA para o tratamento das formas recorrentes da EM. Este fármaco atua como um agente de imunomodulação, apresentando propriedades antiproliferativas e anti-inflamatórias, sendo capaz em reduzir o número de linfócitos ativados no SNC (BIOTTI & CIRON, 2018; TILLERY *et al.*, 2018). Mais especificamente, a teriflunomida inibe a enzima diidroorotato desidrogenase, impedindo a síntese das pirimidinas. A inibição dessa enzima, por sua vez, impossibilita a divisão celular das células do sistema imunológico, incluindo os linfócitos T, linfócitos B e a micróglia, (TABANSKY *et al.*, 2015; DOLATI *et al.*, 2017; FAISSNER & GOLD, 2018). Sua forma de administração consiste em uma única dose diária oral (BIOTTI & CIRON, 2018; TILLERY *et al.*, 2018).

As reações adversas mais comuns associadas à terapia com teriflunomida (incidência 10%) são fadiga, distúrbios sensoriais, infecções leves (FAISSNER & GOLD, 2018) cefaléia, diarreia, náusea, alopecia, hipertensão, linfopenia, neuropatia periférica e aumento dos níveis de alanina transaminase (ALT). Apesar de sua fácil administração, este medicamento apresenta serias restrições, sendo totalmente contra-indicado em pacientes com doença hepática aguda ou crônica preexistente, assim como, é contra-indicado em mulheres com potencial para engravidar devido sua associação com o desenvolvimento fetal incompleto. Assim as desvantagens associadas ao uso da teriflunomida são seus efeitos hepatotóxicos e teratogênicos (DOLATI *et al.*, 2017; TILLERY *et al.*, 2018).

1.1.5.4 Fingolimoide

O fingolimoide foi o primeiro medicamento oral aprovado pelo FDA para tratar pacientes com EMSR. Foi aprovado em 2010, e é categorizado como um modulador do receptor de esfingosina-1-fosfato (RE1F). Este fármaco atua através da internalização e degradação do RE1F principalmente nos linfócitos T, micróglia e astrócitos (FAISSNER & GOLD, 2018), bloqueando a saída dos linfócitos a partir dos gânglios linfáticos (TABANSKY *et al.*, 2015; DOLATI *et al.*, 2017; TILLERY *et al.*, 2018). Tal mecanismo diminui os linfócitos disponíveis no SNC, resultando na redução da inflamação central. O medicamento é administrado via oral através de uma única dose. Após a administração, as concentrações plasmáticas máximas do fingolimoide são atingidas em 12 a 16 horas (TILLERY *et al.*, 2018).

As reações adversas mais comuns associadas à terapêutica com fingolimoide (incidência 10%) são cefaleias, elevação das transaminases hepáticas, diarreia, tosse, gripe, sinusite e dor nas costas (TILLERY *et al.*, 2018). Outros efeitos colaterais observados são bradicardia, bloqueio da condução atrioventricular e hipertensão, assim como, leucoencefalopatia multifocal progressiva, linfopenia, melanoma (DOLATI *et al.*, 2017; AURICCHIO *et al.*, 2017; MAAROUF *et al.*, 2018), carcinoma basocelular e dispneia podendo causar a descontinuação do paciente ao tratamento (FAISSNER & GOLD, 2018). As desvantagens incluem a exigência de monitoramento da primeira dose, contraindicações na doença cardíaca, risco de edema macular e potencial elevação das enzimas hepáticas (TILLERY *et al.*, 2018).

1.1.5.5 Natalizumab

O natalizumab foi o primeiro anticorpo monoclonal aprovado para o tratamento intravenoso da EM (TABANSKY *et al.*, 2015). Consiste em um anticorpo que bloqueia moléculas de adesão presente nos linfócitos, prevenindo sua interação com o endotélio, e conseqüentemente, inibindo o recrutamento leucocitário através da BHE (AURICCHIO *et al.*, 2017; MAAROUF *et al.*, 2018).

Primeiramente, este fármaco foi aprovado em 2004, entretanto foi rapidamente retirado do mercado devido a três casos de leucoencefalopatia multifocal progressiva associada a infecção pelo vírus John Cunningham (VJC). Posteriormente em 2006, o natalizumab retornou ao mercado farmacêutico, porém, apresentando diversas

restrições (RATCHFORD *et al.*, 2014; DOLATI *et al.*, 2017). Os efeitos adversos mais comuns observados com a administração deste fármaco são fadiga, reações alérgicas e congestão da garganta, nariz e ouvidos. Além disso, conforme citado anteriormente, o uso do natalizumbab também está associado a leucoencefalopatia multifocal progressiva (AURICCHIO *et al.*, 2017; MAAROUF *et al.*, 2018).

1.1.5.6 Alemtuzumab

Assim como o interferon Beta, o Alemtuzumab foi aprovado pela FDA, em 2014, para o tratamento das formas recorrentes da EM. Este medicamento consiste em um anticorpo monoclonal anti-CD52 que se liga a antígenos CD52 presentes na superfície de linfócitos B, linfócitos T, monócitos, macrófagos, células *natural killer* e alguns granulócitos, interrompendo sua capacidade de infiltrar no cérebro e destruir a mielina. O fármaco é administrado por via intravenosa (TABANSKY *et al.*, 2015; TILLERY *et al.*, 2018).

Muitos efeitos adversos estão associados ao uso deste medicamento, incluindo o risco de doenças autoimunes graves e às vezes fatais (MAAROUF *et al.*, 2018; TILLERY *et al.*, 2018), reações à infusão e várias doenças malignas. As reações adversas mais comuns associadas à terapia com alemtuzumab (incidência 10%) são erupção cutânea, cefaléia, vômitos, náusea, diarreia, rubor, dor abdominal, pirexia, nasofaringite, infecção do trato urinário, fadiga, insônia, infecção do trato respiratório superior, infecção por herpes viral, urticária, prurido, distúrbios da glândula tireóide, infecções fúngicas, artralgia, dor nas extremidades, sinusite, dor orofaríngea, parestesia e tontura. Apesar das possíveis complicações e efeitos adversos graves, em ensaios clínicos, o alemtuzumab foi significativamente mais eficaz na redução do número de surtos e do risco de incapacidade em comparação com terapia interferon Beta (AURICCHIO *et al.*, 2017; TILLERY *et al.*, 2018).

1.1.5.7 Mitoxantrona

Por quase uma década, o interferon beta e o acetato de glatirâmer foram as únicas drogas validadas para o tratamento da EM. A mitoxantrona, por sua vez, foi aprovada pela FDA, em 2000, e é hoje considerada uma terapia de segunda linha para EM, apresentando efeitos antiinflamatórios bem estabelecidos (AURICCHIO *et*

al., 2017; MAAROUF *et al.*, 2018). Este fármaco, administrado de forma intravenosa, demonstrou ser um agente imunossupressor razoavelmente eficaz, exercendo seus efeitos citotóxicos sobre as células B, bem como para os linfócitos T auxiliares e T-citotóxicos (TABANSKY *et al.*, 2015; AURICCHIO *et al.*, 2017). No entanto, seu uso está associado a severos efeitos adversos como falência cardíaca congestiva, leucemia aguda, aminorréia persistente e encefalopatia progressiva multifocal (MAAROUF *et al.*, 2018).

1.1.5.8 Daclizumab

O daclizumab é em um anticorpo monoclonal anti-CD25, aprovado em 2016 pelo FDA, para tratar pacientes com EMSR. (PAPADOPOULOU *et al.*, 2017). Este fármaco é capaz de bloquear o CD25, que consiste em um receptor de IL-2 expresso na superfície das células T, impedindo assim, a ativação de desses linfócitos. O daclizumab é administrado de forma subcutânea uma vez ao mês. Foi originalmente aprovado pelo FDA em 1997 para prevenir a rejeição em transplantes renais, porém seu uso foi interrompido devido à baixa demanda do mercado (DARGAHI *et al.*, 2017; FAISSNER & GOLD, 2018).

Alguns dos efeitos adversos relacionados ao uso do daclizumab são a nasofaringite infecção do trato respiratório superior, aumentos séricos de enzimas hepáticas, pneumonia, colite ulcerativa, infecção do trato urinário, erupções cutâneas, dermatite e psoríase. Além disso, casos fatais foram relatados em estudos clínicos (PREININGEROVA & VACHOVA, 2017; ROMMER & ZETTL, 2018). Devido a possíveis efeitos teratogênicos, o daclizumab deve ser descontinuado em doentes que planejam engravidar (FAISSNER & GOLD, 2018). Este medicamento foi retirado do mercado mundial em 2 de março de 2018 devido a relatos de encefalite inflamatória e meningoencefalite (ROMMER & ZETTL, 2018).

1.1.5.9 Dimetil fumarato (DMF)

O DMF é um medicamento quem tem sido utilizado no tratamento de doenças autoimunes como a psoríase, desde 1990, e na esclerose múltipla, desde 2013, (HAN, *et al.*, 2016). Esse fármaco, considerado como terapia oral de primeira linha (BURNES, 2014; LINKER, 2016), possui a capacidade de modular as células

imunológicas, melhorando o curso clínico da Esclerose Múltipla (AL-JADERI, 2016). Primeiramente, o DMF administrado via oral é rapidamente metabolizado em monometil fumarato (MMF), o qual atravessa a barreira hematoencefálica, alcançando o parênquima do sistema nervoso central (AL-JADERI, 2016; PARODI, 2015).

Estudos tem demonstrado que o DMF promove a diferenciação dos linfócitos T em Th2, potencializando a ativação do fator de transcrição Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2) que, por sua vez apresenta efeitos citoprotectores em oligodendrócitos, neurônios e células gliais, propriedades antioxidativas, além de participar da regulação da imunidade, contribuindo, dessa forma, com a resposta anti-inflamatória (AL-KHAMIS, 2016; HAN *et al.*, 2016; TOPPHOFT *et al.*, 2016). Além disso, esse fármaco pode atuar sobre astrócitos e micróglia inibindo a síntese de mediadores neuroinflamatórios (PARODI, 2015).

Um estudo recente mostrou que o DMF atua no receptor do ácido hidroxicarboxílico 2 (HCAR2), que é uma proteína G acoplada a membrana celular, promovendo seus diversos efeitos no organismo como a inibição do infiltrado de neutrófilos (PARODI, 2015). Segundo PARODI (2015), o monometil fumarato, (agonista potente do HCAR2) liga-se a receptores HCAR2 presentes na membrana plasmática da micróglia desencadeando a ativação da via AMPK/SIRT, causando a inibição do NF- κ B e conseqüentemente, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, o bloqueio do HCAR2 reverte completamente os efeitos do MMF em se tratando da expressão de mRNA mensageiro (mRNA) de moléculas de resposta inflamatória e oxidativa tais como o TNF- α , IL-1 β dentre outras (PARODI, 2015).

O HCAR2, também conhecido como receptor do ácido nicotínico é expresso em diversas células do sistema imune como monócitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, como também nos queratinócitos, epitélio intestinal, epitélio pigmentar da retina e no tecido adiposo branco e marrom (BLAD *et al.*, 2012).

Apesar dos efeitos benéficos adquiridos com a utilização do DMF, os diversos efeitos colaterais provocados pela droga ainda têm contribuído pela descontinuidade do tratamento pelo paciente (PHILLIPS *et al.*, 2015). Segundo AL-KHAMIS (2016), os efeitos adversos mais comuns apresentados pelo paciente são tosse ou rouquidão, sensação de calor, febre ou calafrios, dor na região inferior ou lateral das costas, dificuldade e/ou dor durante a micção e vermelhidão no rosto, pescoço e braços.

Estudo realizado por XU e colaboradores (2015), demonstrou que os principais eventos adversos causados pela droga são aqueles relacionados ao sistema gastrointestinal tais como dor abdominal superior, náuseas e diarreia. A linfopenia, leucopenia, presença de cetonas na urina, redução da vitamina D e hipersensibilidade cardiovascular, gastrointestinal, dermatológica e hepática assim como erupção cutânea, vômitos, dispepsia e leucoencefalopatia multifocal progressiva também são considerados efeitos colaterais do dimetil fumarato (AL-KHAMIS, 2016; SORENSEN, 2016).

Tabela 1: Principais fármacos utilizados para o tratamento da EM, suas respectivas vias de administração e principais efeitos colaterais

Fármaco	Via de administração	Principais efeitos adversos
Interferon Beta	s.c	Complicações hepáticas, e imunológicas, doença renal, linfopenia, leucopenia.
Acetato de glatirâmer	s.c	Lipoatrofia e necrose da pele, infecções urinária e do trato respiratório superior, insônia, parestesia e dor.
Teriflunomida	v.o	Distúrbios sensoriais, linfopenia, neuropatia periférica, efeitos hepatotóxicos.
Fingolimoide	v.o	Bradycardia, bloqueio da condução atrioventricular, LMP, linfopenia, melanoma.
Natalizumab	i.v	LMP, reações alérgicas e congestão da garganta, nariz e ouvidos
Alemtuzumab	i.v	Infecção do trato urinário, e respiratório, fadiga, insônia, infecção por herpes viral e fúngica, distúrbios da glândula tireóide, parestesia e tontura.
Mitoxantrona	i.v	Falência cardíaca congestiva, leucemia aguda, aminorreia persistente, encefalopatia progressiva multifocal.
Daclizumab	i.v	Dermatite, psoríase, encefalite inflamatória e meningoencefalite.
Dimetil fumarato	v.o	Linfopenia, leucopenia, redução da vitamina D e hipersensibilidade cardiovascular, gastrointestinal, dermatológica e hepática.

s.c: subcutânea; v.o: via oral; i.v: intravenosa; LPM: a leucoencefalopatia multifocal progressiva.

1.2 Modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental

Para o estudo da EM em animais, modelos de EAE têm sido frequentemente utilizados. Esse modelo de EAE caracteriza-se pelo desenvolvimento de um processo inflamatório, desmielinização, perda axonal e gliose de forma similar às condições clínicas em humanos (PEDRO *et al.*, 2013; GOUDARZVAND *et al.*, 2016; NUROGYINA *et al.*, 2016). Na EAE, assim como na EM, a patogenia da doença está associada, dentre outros fatores, com as espécies reativas de oxigênio (ROS) e com as espécies reativas de nitrogênio (RNS), que são geradas principalmente pelos monócitos que formam o infiltrado inflamatório, causando danos ao tecido nervoso (STOJIC-VUKANIC *et al.*, 2018). A indução da EAE pode ocorrer de diversas maneiras como através da imunização pela proteína básica da mielina (PBM), homogenato da medula espinhal, proteínas proteolípídicas ou pela proteína da mielina de oligodendrócitos (ROBINSON *et al.*, 2014; DE BRUIN *et al.*, 2016).

. O período inicial da EAE é caracterizado por infiltrado inflamatório perivascular, predominantemente de linfócitos B, linfócitos T e macrófagos, na substância branca do SNC. Com o desenvolvimento da doença, a resposta inflamatória é acompanhada pela ativação da microglia e astrócitos, desmielinização e perda axonal, principalmente no pico da doença (BERNARDES *et al.*, 2016). O grau de tecido danificado correlaciona-se com o déficit funcional observado após o início da EAE (BJELOBABA *et al.*, 2018). As alterações mais pronunciadas são confinadas principalmente à medula espinhal, embora um certo grau de desmielinização também é detectada no nervo óptico, no córtex cerebral e no cerebelo (PALUMBO & PELLEGRINI, 2017; BJELOBABA *et al.*, 2018; STIMMER *et al.*, 2018). A doença segue um curso clínico clássico e previsível, caracterizado pelo início dos sintomas motores após 10-15 dias pós imunização. Primeiramente, a paralisia inicia-se pela cauda, adquirindo um padrão ascendente com progressão das patas posteriores para as anteriores, associado a perda de peso (ROBINSON *et al.*, 2014).

1.3 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um papel chave no controle da pressão arterial (PA) e no balanço hidroeletrólítico (SPARKS *et al.*, 2014). Primeiramente a renina degrada o angiotensinogênio em Angiotensina I (Ang I), que

por sua vez é quebrada em Angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A degradação da Ang II ocorre por ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), originando dessa forma o subproduto Angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)] (VAZ-SILVA *et al.*, 2012; NEMOTO *et al.*, 2014). A representação esquemática deste importante sistema está representada na figura 2.

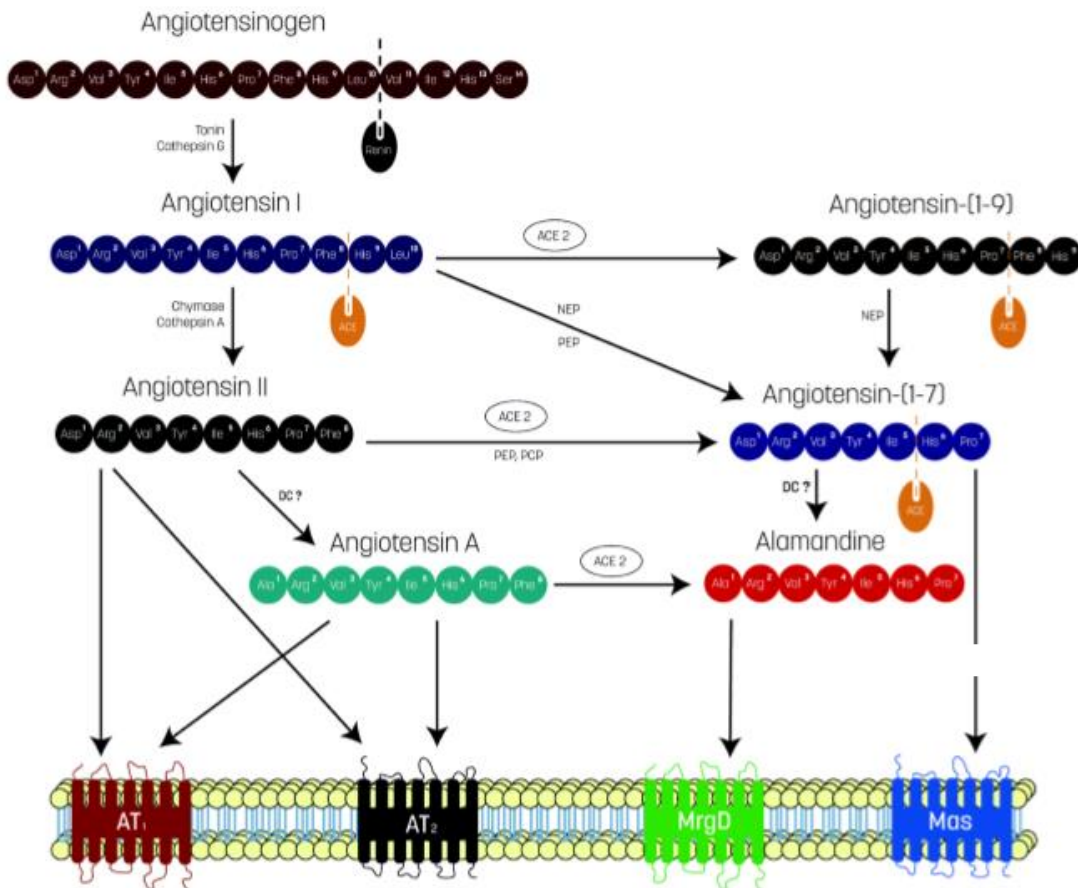


Figura 2: Visão esquemática e atualizada do Sistema Renina-Angiotensina. ACE: enzima conversora da angiotensina; ACE 2: enzima conversora da angiotensina 2; AT1: receptor da angiotensina do tipo 1; AT2: receptor da angiotensina do tipo 2; Mas: receptor Mas; MrgD: receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas - tipo D; DC: descarboxilase; NEP: endopeptidase neutra (neprilisina); PEP: prolilendopeptidase; e PCP, prolil carboxipeptidase. (ALMEIDA-SANTOS, *et al.*, 2017)

A Ang II, consiste em um dos principais peptídeos deste sistema, sendo capaz de se ligar com os receptores da angiotensina do tipo 1 (AT1) e com os receptores da angiotensina do tipo 2 (AT2), causando diversas respostas no organismo, incluindo no coração, rins, vasculatura, cérebro e no sistema imunológico (SPARKS *et al.*, 2014; MIYAJIMA *et al.*, 2015). Esse hormônio também atua como um potente mediador pró-inflamatório, ativando a cascata do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), importante citocina fibrótica e apoptótica. (MIYAJIMA *et al.*, 2015; PAN & LU, 2017; KIM *et al.*, 2018). De fato, o eixo ECA/ Ang II/ receptor AT1 está relacionado a inúmeras

ações inflamatórias, incluindo a produção de radicais livres, ativação de proteínas quinases e fatores de transcrição nuclear, recrutamento de células inflamatórias e estimulação da expressão, síntese e liberação de citocinas e quimiocinas (SIMÕES E SILVA *et al.*, 2013). Por sua vez, a atividade inapropriada e exacerbada desse eixo está envolvida na patogenia de diversas doenças cardiovasculares (KANGUSSU *et al.*, 2015), assim como está associada ao aumento do estresse oxidativo, dano isquêmico cerebral, prejuízo cognitivo e inflamação cerebral (GEBRE *et al.*, 2018). Alguns estudos têm demonstrado que o bloqueio do receptor AT1 é capaz de atenuar os déficits cognitivos evidenciados na doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e em outras patologias que cursam com prejuízo cognitivo (GEBRE *et al.*, 2018; JACKSON *et al.*, 2018) .

Conforme especificado anteriormente, a Ang-(1-7), proteína derivada primariamente da ação ECA 2 sobre a Ang II, atua no receptor Mas, sendo responsável por contrabalancear a ação da Ang II. Dessa forma, como é bem descrito na literatura, a atuação do eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor MAS desencadeia um papel importante para atenuar os efeitos da angiotensina II, apresentando fortes características cardioprotetoras (GUIMARAES *et al.*, 2014; KANGUSSU *et al.*, 2015, HAY *et al.*, 2017).

Diversas evidências tem demonstrado o papel anti-inflamatório e antioxidante do eixo ECA 2/ Ang-(1-7)/ Receptor Mas em várias condições patológicas incluindo modelos animais de colite (KHAJAH *et al.*, 2017), asma (MAGALHAES *et al.*, 2018), esofagite aguda de refluxo (PAWLIK *et al.*, 2014) e hipertensão pulmonar (SHENOY *et al.*, 2014). No entanto, sua função e mecanismo de ação em doenças neurodegenerativas ainda não estão bem elucidados (GOLDSTEIN *et al.*, 2016).

Segundo LIU *et al.*, (2016) além do papel protetor na regulação cardiovascular, a Ang-(1-7) pode exercer efeitos imunoregulatórios no SNC. Nesse mesmo estudo, foi evidenciado que o receptor Mas está presente em culturas microgliais preparadas a partir do hipotálamo e que a Ang-(1-7) foi capaz de reduzir a expressão de mRNA relacionados a citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e de aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (LIU *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7) apresenta efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes e vasodilatadores (PADDA *et al.*, 2015; BENNION *et al.*, 2016), além de desempenhar um papel neuroprotetor em animais submetidos ao protocolo de acidente vascular encefálico como o de reduzir o volume de infarto cerebral (JIANG *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2013,

BENNION *et al.*, 2015; BENNION *et al.*, 2018). Outro estudo demonstrou que esse mesmo eixo encontra-se desregulado na doença de Alzheimer podendo contribuir para a patogenia da doença (KEHOE *et al.*, 2016).

Estudo prévio sugeriu a existência de uma relação entre a redução da atividade do eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas em condições autoimunes, incluindo a EM (HAMMER *et al.*, 2016). Neste mesmo estudo foi observado que animais knockout para o receptor Mas, quando submetidos a indução da EAE, apresentaram aumento exacerbado do infiltrado de macrófagos na medula espinhal avaliada através da técnica de imunohistopatologia, quando comparados com animais WT com EAE. Além disso, a deficiência do receptor Mas também resultou em aumento da desmielinização e perda axonal na medula espinhal prejudicando o curso clínico da doença (HAMMER *et al.*, 2016).

1.4 Receptor Mas e suas funcionalidades

O receptor Mas consiste em receptor transmembrana acoplado à proteína G, composto por 7 domínios, na qual a Ang-(1-7) é capaz de atuar (KARNIK *et al.*, 2015; HAMMER *et al.*, 2017). No camundongo, o receptor Mas está presente em diferentes tecidos e células como nos rins, baço, testículos, glândulas adrenais, fibroblastos cardíacos, cardiomiócitos, células do sistema vascular, na retina ocular de humanos e na artéria aorta (VAAJANEN *et al.*, 2015; AKHTAR *et al.*, 2015; HAMMER *et al.*, 2016). Especificamente no cérebro, o receptor Mas foi evidenciado em neurônios do hipocampo, córtex cerebral, giro denteado, tubérculo olfativo e o bulbo olfatório de roedores (PRASAD *et al.*, 2014; KARNIK *et al.*, 2015; GIRONACCI *et al.*, 2018), assim como, no epitélio do plexo coroide, endotélio cerebral, hipotálamo, amígdala, gânglios da base e no córtex piriforme (FREUND *et al.*, 2012; GEBRE *et al.*, 2018). O receptor Mas também já foi identificado em diversas células do sistema imunológico tais como as células dendríticas derivadas da medula óssea de ratos (NIE *et al.*, 2009), eosinófilos de murinos e humanos (MAGALHAES *et al.*, 2018), macrófagos (AKHTAR *et al.*, 2015, HAMMER *et al.*, 2016) e micróglia (REGENHARDT, *et al.*, 2013; JACKSON *et al.*, 2018), sugerindo a relação do receptor Mas em processos inflamatórios.

De forma geral, a ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) estimula a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais através do eixo fosfoinositídeo 3-quinase

(PI3K)/ Proteína quinase B (Akt), o que causa, inibição do crescimento celular e bloqueio do AT1 (BIAN *et al.*, 2013). A ausência funcional do receptor MAS associa-se com uma resposta inflamatória cerebral exacerbada após desafio com LPS, por intensificar o processo de adesão leucocitária, favorecendo o recrutamento de neutrófilos e monócitos, aumentando os mediadores cerebrais e sanguíneos no cérebro e medula e modulando a ativação de neutrófilos e monócitos na medula óssea (OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2015).

1.5 Via nasal de administração de fármacos

A via de administração dos fármacos representa um importante fator que contribui para a descontinuidade do paciente ao tratamento. Por sua vez a via inalatória consiste em uma forma alternativa de administração de fármacos principalmente para o SNC, apresentando diversos benefícios em comparação com as formas intravenosas ou orais. Primeiro, a entrega intranasal de moléculas proporciona um acesso direto ao SNC, através da via olfativa ou trigeminal, sem necessariamente ter que transpor a BHE (MEREDITH *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2018). Em segundo lugar, a exposição de órgãos periféricos e tecidos ao fármaco geralmente é bastante reduzida, atenuando dessa forma, os possíveis efeitos adversos. E em terceiro lugar, do ponto de vista clínico terapêutico, é bem reconhecido que a administração intranasal de drogas consiste em uma forma de administração não é invasiva (MEREDITH *et al.*, 2015).

Através da via de administração intranasal, os fármacos podem atingir o sistema nervoso central por meio de vias diretas ou indiretas. A via direta envolve os bulbos olfatórios e o nervo trigêmeo, dando acesso direto ao cérebro (MARIJON *et al.*, 2014; SHOBO *et al.*, 2018). O bulbo olfatório é projetado para diferentes regiões do cérebro, como o córtex piriforme, a amígdala e o hipotálamo, sendo útil para a administração direta de drogas ao cérebro. Por sua vez, o nervo trigêmeo, quinto nervo craniano, apresenta três ramos; nervo oftálmico, nervo maxilar e nervo mandibular, sendo responsável pela sensação na cavidade nasal. Os nervos oftálmicos e maxilares inervam a mucosa nasal e carregam as informações necessárias da cavidade nasal para o SNC (KHAN *et al.*, 2017). A via indireta, por outro lado, transporta as drogas para o cérebro através do sistema linfático. (SHOBO *et al.*, 2018) (Figura 3). Entretanto, os possíveis mecanismos pelos quais as drogas

administradas por via nasal têm acesso ao sistema nervoso central ainda não estão bem elucidados na literatura.

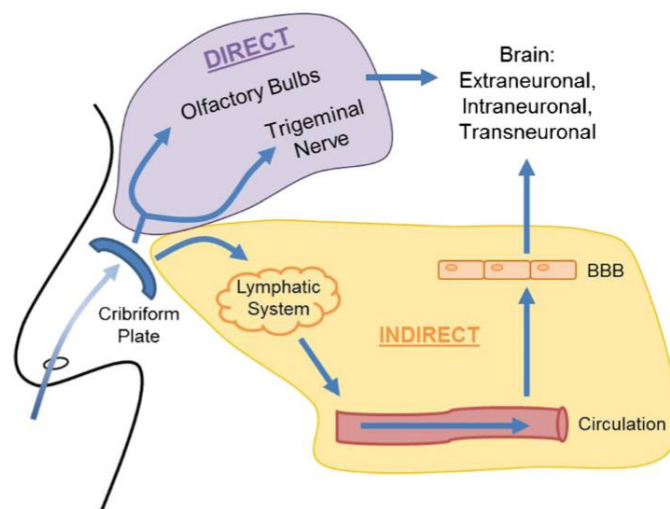


Figura 3: Representação esquemática da via direta e indireta da administração nasal de fármacos. (MEREDITH *et al.*, 2015)

1.6 Nanocarreadores como sistemas de *delivery* de drogas

As nanopartículas são estruturas com dimensões em nanoescala que apresentam a capacidade de atuar como transportadores de substâncias. Esses nanocarreadores podem transportar uma variedade de moléculas, incluído anticorpos, RNA, agentes de contrastes, proteínas e peptídeos. Existe diversos tipos de nanopartículas como os nanocristais, nanonubos, nanopartículas poliméricas, nanofios, hidrogéis, dendrímeros e as nanopartículas estruturadas por lipídeos. (KHOSA *et al.*, 2018). Devido seu papel carreador, as nanopartículas tem sido utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças tais como câncer, aterosclerose, degeneração dos discos intervertebrais, doenças cardiovasculares e doenças cérebro vasculares (TAPEINOS *et al.*, 2017).

Os transportadores a base de lipídeos podem ser divididos em várias categorias e têm sido utilizados para o tratamento de doenças cerebrais nos últimos 30 anos. Os principais componentes deste tipo de nanoestrutura são os niosomos, transferossomos, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados e os lipossomas. Essas nanoestruturas, devido seu pequeno tamanho e sua composição lipídica, possuem uma capacidade inerente de atravessar a BHE (TAPEINOS *et al.*, 2017).

Por sua vez, os lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas (TAPEINOS *et al.*, 2017; KHOSA *et al.*, 2018) que isolam compartimentos aquosos internos do meio externo. Eles podem encapsular substâncias hidrófilas e/ou lipofílicas no compartimento aquoso interno e na membrana, respectivamente (FONTES *et al.*, 2018). Estas estruturas unilamelares apresentam um diâmetro que varia entre 10 a 1000 nm e compreendem a primeira geração de nanoestruturas lipídicas que foram utilizadas para administração parenteral de drogas (TAPEINOS *et al.*, 2017).

Os lipossomas tornaram-se uma maneira cada vez mais interessante de direcionamento de fármacos devido sua capacidade de prevenir a rápida degradação da substância incorporada, promover a penetração através da BHE (AMBHORE *et al.*, 2017) além de apresentar alta eficiência de carregamento e alta biocompatibilidade (TAPEINOS *et al.*, 2017; FONTES *et al.*, 2018). Os lipossomas também possuem habilidade de encapsular e distribuir grandes quantidades de fármacos, assim como podem incorporar diferentes ligantes em sua superfície (LAI *et al.*, 2013). São estruturas não tóxicas, não imunogênicas, não carcinogênicas, não trombogênicas e biodegradáveis (AMBHORE *et al.*, 2017), podendo ser utilizadas por todas as vias de administração (MONTENEGRO *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm empregado o uso de nanopartículas associadas a diferentes fármacos para o tratamento de doenças do SNC, incluindo modelos animais de isquemia, DA e DP (MORALES-ZAVALA *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017; LAFUENTE *et al.*, 2017; HEGAZY *et al.*, 2017; DARABI & MOHAMMADI, 2017; PARTOAZAR *et al.*, 2017; KAWAGUCHI *et al.*, 2017; KHERADMAND *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2018; YAN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). No entanto, poucos trabalhos têm associado essas nanoestruturas em modelos de EM (BINYAMIN *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2018). Em estudo realizado por KUMAR e colaboradores (2018), foi evidenciado que animais modelos de desmielinização induzida por cuprizona apresentaram aumento da atividade locomotora, da coordenação motora, assim como, maior taxa de mielinização cerebral quando submetidos a administração oral de DMF em nanopartículas ao serem comparados com o grupo que apenas recebeu DMF puras.

2. JUSTIFICATIVA

A Esclerose múltipla é uma doença de caractere autoimune (DENDROU *et al.*, 2015) considerada a causa mais comum de incapacidade neurológica de origem não traumática (LIEBNER *et al.*, 2018). A EM é incurável e irreversível, no entanto, diversos fármacos têm sido utilizados para o tratamento da doença. Atualmente, as terapias empregadas geralmente estão associadas a métodos inconvenientes de administração e efeitos colaterais severos (GLANZ *et al.*, 2014; SCOLDING *et al.*, 2017). As terapias imunossupressoras, por exemplo, são administradas por via endovenosa, as quais a longo prazo, levam a efeitos colaterais graves, contribuindo para a baixa taxa de adesão e tendência a descontinuidade do tratamento (GLANZ *et al.*, 2014; SCOLDING *et al.*, 2017). Assim, novas vias e formas de tratamento para EM devem ser investigadas, com o objetivo de facilitar e contribuir para a adesão ao tratamento, e conseqüentemente, prolongar e melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Os lipossomas consistem em vesículas lipídicas cujo objetivo é de potencializar a entrega de fármacos para o órgão alvo (AMBHORE *et al.*, 2017). Atualmente, já estão descritos na literatura os diversos benefícios cardiovasculares causados pela Ang-(1-7). Além dos efeitos no sistema cardiovascular, sua ação se estende a condições inflamatórias presentes no sistema nervoso central, como AVC, doença de Parkinson, e neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da Ang-(1-7) encapsuladas por lipossomas na resposta neuroimune associada à Esclerose Múltipla.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas administrada por via inalatória em camundongos com encefalomielite autoimune experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da administração inalatória de Ang-(1-7) associada a lipossomas sobre o escore clínico e o peso corporal dos animais ao longo de 20 dias;
- Avaliar a correlação entre o peso corporal e o escore clínico dos animais;

Em todos objetivos específicos a seguir, os parâmetros foram avaliados no 20^o dia após indução da EAE:

- Verificar o efeito da administração inalatória de Ang-(1-7) em lipossomas sobre a permeabilidade vascular no cérebro, medula espinhal, pulmão e baço;
- Quantificar por ELISA as interleucinas IL-10, IL-6, IL-1 β e TNF- α nos tecidos do cérebro e medula dos animais com EAE/controle submetidos ou não ao tratamento inalatório de Ang-(1-7) associada a lipossomas;
- Avaliar o efeito da inalação de Ang-(1-7) em lipossomas sobre as interações leucócito-endotélio na microcirculação medular por meio da microscopia intravital;
- Mensurar a ação do tratamento inalatório de Ang-(1-7) em lipossomas sobre o mecanismo de infiltração celular no parênquima da medula espinhal através da técnica de histologia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento experimental

Para os protocolos experimentais foram utilizados camundongos, fêmeas, da linhagem C57Bl/6J, com idade de 12 semanas, procedentes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-UFMG). Os protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG), protocolo nº 182/2017. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (30x20x13cm) sob condições ambientais padrão com ciclo claro-escuro de 12:12 horas, recebendo água e alimento *ad libitum* durante todo o período experimental. Após atingirem o peso de 20 gramas e 12 semanas de idade, os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: grupo controle, grupo controle + lipossomas, grupo controle + Ang-(1-7), grupo controle + lipossomas + Ang-(1-7), grupo EAE, grupo EAE + lipossomas, grupo EAE + Ang-(1-7) e grupo EAE + lipossomas + Ang-(1-7) (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos grupos experimentais

Grupos Experimentais	
Grupos Controles (CTRL)	Grupos doentes (EAE)
CTRL Administração inalatória de salina	EAE Administração inalatória de salina
CTRL + lipo Administração inalatória de lipossomas em solução	EAE + lipo Administração inalatória de lipossomas em solução
CTRL + Ang-(1-7) Administração inalatória de Ang 1-7 em solução	EAE + Ang-(1-7) Administração inalatória de Ang 1-7 em solução
CTRL + lipo + Ang-(1-7) Administração inalatória de lipossomas com Ang 1-7 em solução	EAE + lipo + Ang-(1-7) Administração inalatória de lipossomas com Ang 1-7 em solução

Durante 20 dias, a cada 72 horas, incluindo o dia da indução da EAE (dia 0), os animais receberam os respectivos tratamentos por via inalatória no turno matutino. A inalação foi realizada através do nebulizador-inalador, gentilmente doado pela empresa Soniclear. Em função do tratamento, diferentes soluções eram colocadas no

nebulizador: solução salina 0,9% e Ang-(1-7) (0,6 μ g/ml/animal), solução salina 0,9% e Ang-(1-7) associada a lipossomas (1,8 μ g/ml/animal). Os grupos controle e EAE foram submetidos a inalação de 1ml de solução salina 0,9%/animal. O tempo de nebulização para cada grupo foi de aproximadamente 15 minutos, sendo que o próprio aparelho informava quando a solução era totalmente nebulizada. A figura 4 representa de forma esquemática o delineamento experimental do estudo ao longo do tempo e a figura 5 demonstra o processo de nebulização.

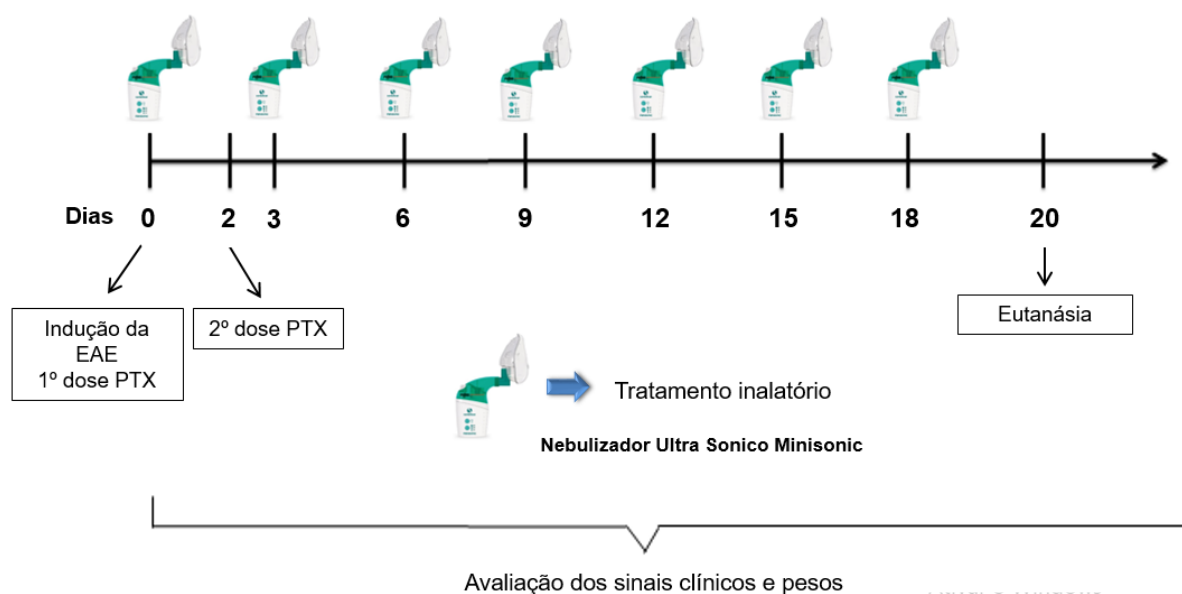


Figura 4: Representação esquemática do delineamento experimental. Os respectivos tratamentos foram realizados a cada 72 horas. Todos os animais foram eutanasiados no 20º dia após a indução.



Figura 5: Representação do processo de nebulização. A nebulização foi realizada através do nebulizador/inalador da marca Soniclear.

4.2 Indução do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)

A EAE foi induzida como descrito previamente por Santos *et al.* (2005), Bernardes *et al.* (2013, 2015) em animais C57Bl/6J, fêmeas, com 12 semanas de idade. Inicialmente os animais foram pesados e tricotomizados na região da base da cauda, local da injeção da emulsão antigênica. Após tais procedimentos os animais foram mantidos para habituação no local de indução. Para indução, cada animal foi imunizado com duas injeções subcutâneas, com 50 µL cada, aplicadas próximas a base da cauda, sendo uma no dorso inferior esquerdo e outra no direito (previamente depilados). A emulsão inoculada constitui de uma solução contendo 100 µg de peptídeo murinho MOG₃₅₋₅₅, (sequência MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) diluídos em 50µL de salina 0,9% e 50µL de Complexo adjuvante de Freund (CFA) suplementado com 4,0 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Para a emulsão alcançar uma viscosidade ideal, ambas soluções foram misturadas utilizando duas seringas de vidro acopladas a um *threeway* na sequência de 3 séries de 5 minutos de homogeneização, intercaladas por repouso de 3 minutos em gelo.

Além disso, foi administrada uma injeção intraperitoneal de Pertussis toxina (Sigma Chemical, EAU), 300ng/200µl/animal em salina 0,9%, no momento da indução, e uma segunda dose após 48 horas. Os animais do grupo controle receberam um esquema similar de injeções contendo salina nos mesmos locais anatômicos com o objetivo de mimetizar o estresse sofrido pelos grupos EAE durante a indução do modelo experimental.

4.3 Preparo dos Lipossomas

Os lipossomas foram preparados utilizando os seguintes lipídeos: diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietileno glicol 2000 (DSPE-PEG2000) ambos adquiridos pela Lipoid GmbH (Alemanha) e colesterol (CHO) adquirido pela Sigma-Aldrich Co. (Estados Unidos) na proporção molar de 10:5:1, respectivamente.

O método de preparo dos lipossomas foi o de congelamento-descongelamento descrito por KIRBY e colaboradores (KIRBY & GREGORIADIS, 1984). Em suma, os lipídeos supracitados, foram solubilizados em clorofórmio em balão de fundo redondo

que posteriormente foi levado ao evaporador rotativo com aquecimento a 60°C, sob vácuo, para evaporação do solvente e formação do filme lipídico. Após a retirada de todo solvente, o filme lipídico formado foi hidratado com água deionizada por 60 minutos a 60°C, sem vácuo. Após a hidratação do filme lipídico, os lipossomas passaram um processo de congelamento-descongelamento (5 ciclos). Em seguida, as vesículas foram submetidas a um processo de calibração de tamanho por filtração repetida a 65°C, através de membrana de policarbonato com poro de 200nm (5x) e 100 nm (5x), usando uma extrusora (Extruder 10-mL, Nothern Lipid Inc, Canadá; GE Whatman). 1 mL da dispersão de lipossomas de tamanho calibrado foi hidratado com 1 mL de solução de Ang-(1-7) (3 mg/L em NaCl 0,03 M) e liofilizado e armazenado a -20°C. As amostras liofilizadas foram então reidratadas em 0,2 mL de água deionizada e incubadas por 30 min à 55°C com agitação a cada 10 min. Em seguida foram adicionados 0,2 mL de PBS 0,01 M e novamente a dispersão foi incubada por 30 min à 55°C. Por fim completou-se o volume até 1,4 mL com PBS 0,01 M e o mesmo foi submetido a uma nova calibração de tamanho em membrana de 100 nm (5x).

A Ang-(1-7) não encapsulada foi retirada da suspensão de lipossomas através de diálise em PBS 0,01 M à 4°C por 24 horas, com agitação constante.

4.4 Avaliação da evolução clínica do EAE

No dia da indução e a cada 72 horas, ao longo de 20 dias, correspondendo aos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 20, os animais foram pesados e avaliados quanto aos sinais clínicos característicos do modelo. O escore clínico utilizado neste estudo foi adaptado e previamente descrito (BITTNER *et al.*, 2014). Este se caracterizou por atribuição de pontos (0 a 10) de acordo com o fenótipo apresentado na tabela abaixo.

Tabela 3: Escores clínicos

Escores	Sinal clínico
0	Sem sinais clínicos
1	Paresia de cauda
2	Paralisia de cauda
3	Paresia de membros posteriores, movimento descoordenado
4	Paralisia de uma pata posterior
5	Paralisia de ambas patas posteriores
6	Paralisia das patas posteriores e paresia das anteriores
7	Paralisia das patas posteriores e uma pata anterior paralisada
8	Paralisia das patas posteriores e anteriores
9	Moribundo
10	Morte

4.5 Avaliação da permeabilidade vascular

Para a avaliação da permeabilidade vascular, utilizou-se o corante Azul de Evans, um marcador que, devido a sua capacidade de se ligar irreversivelmente à albumina, permite mensurar o extravasamento plasmático como descrito previamente (SARIA & LUNDBERG, 1983). O método consiste na determinação espectrofotométrica da quantidade de Azul de Evans extravasado para o tecido.

Os animais com e sem EAE submetidos ou não ao tratamento com Ang-(1-7) no 20º dia pós indução foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de ketamina (60 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP) e xilazina (10 mg/kg, *Rompun®*, Bayer). Em seguida, administrou-se 200 µL de Azul de Evans 2% no plexo retro-orbital e ao final de uma hora, os animais foram sacrificados, sendo realizada a perfusão transcardíaca.

Os cérebros, medulas, pulmões e baços foram retirados e colocados em placa de Petri aberta para secagem por 48 horas em estufa a 40º C. Então, pesou-se as amostras e foi acrescentado ao tecido 1,0 mL de formamida, para extração do corante, que permaneceu por 48 horas em temperatura ambiente. O corante extraído do tecido foi quantificado por espectrofotometria em leitor de ELISA, utilizando-se o

comprimento de onda de 620 nm (Molecular Devices, USA). A concentração de Azul de Evans foi determinada a partir da curva-padrão com as seguintes concentrações 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625 e 0.3125 pg/mL.

4.6 Microscopia intravital na microvasculadura medular

A microscopia intravital foi realizada nos animais no dia 20^o dia pós-indução da doença, através da exposição da microcirculação da medula espinhal mediante laminectomia. A cirurgia foi feita, a partir de assepsia e anestesia induzida por injeção intraperitoneal (i.p) de uma mistura de ketamina (60 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP) e xilazina (10 mg/kg, Rompun®, Bayer). Em seguida, foi executada a laminectomia, com remoção as lâminas vertebrais da região torácica para a exposição dos vasos da medula. A técnica cirúrgica consiste na realização de cortes profundidade crescente no músculo até atingir as vértebras que serão em seguida seccionadas. Após obter o acesso, foram feitos cortes longitudinais, uma de cada lado da coluna, removendo em torno de 3 a 4 lâminas vertebrais (Figura 6).

Posteriormente, os animais foram submetidos a uma administração 200 µL de Rodamina 6G (SigmaPharm, SP) através do plexo retro-orbital. A rodamina 6 G é um fluorocromo que proporciona a marcação das mitocôndrias de leucócitos e plaquetas seletivamente.

Após a exposição cirúrgica dos vasos superficiais da medula espinhal o animal foi posicionado em uma plataforma de acrílico acoplada ao microscópio de fluorescência (Zeiss Imager M.2), e as janelas foram umedecidas constantemente com solução salina a 9%. A fluorescência associada à rodamina 6G foi visualizada por epi-iluminação (510-560 nm) e filtro de emissão de 590nm.

Os eventos de rolamento e adesão leucocitários sobre o endotélio vascular foram avaliados ao longo do vaso (comprimento 100 µm) durante 20 segundos (n=6-8 vasos/animal), usando objetiva de 20X, tanto na vênula central da medula (localizada na linha mediana da porção dorsal da medula) quando nas vênulas pós-capilares, que drenam o sangue para o vaso central. Foram considerados aderidos os leucócitos que permanecerem no endotélio vascular por um período de 20 segundos, enquanto que o rolamento foi definido para os leucócitos que migraram da região

central para a margem do vaso interagindo com o endotélio com velocidade menor que dos eritrócitos (CARVALHO TAVARES *et al.*, 2000).



Figura 6: Fotografias demonstrativas da microscopia intravital. (A) A fluorescência foi visualizada em microscópio Zeiss Imager M.2, objetiva 20X. (B) Visualização da janela medular observada pela microscopia intravital.

4.7 ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado para mensurar os níveis de citocinas em homogenatos de cérebro e medula espinhal dos camundongos após o período experimental de 20 dias. Esta análise fornece importantes informações sobre a possível polarização das respostas imunes. O espectro de citocinas estudadas incluiu TNF- α , IL-1 β e IL-6 (referidas como pró-inflamatórias) e IL-10 (referida como anti-inflamatória).

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (60mg/Kg, Dopalen, Paulínea, Brasil) e Xilasina (10mg/Kg, Anasedan, Paulínea, Brasil). Imediatamente após a sedação os cérebros e medulas espinhais dos animais foram retirados e devidamente acondicionados em nitrogênio líquido até o final da coleta das amostras.

As amostras dos tecidos foram pesadas e homogeneizadas em solução adequada para extração de citocinas, contendo inibidor de protease preparada a partir de uma solução de PBS 1x (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 μ l de aprotinina). Para cada 100 mg de tecido

foi adicionado 1mL de solução para o processo de homogeneização. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a -20°C até o uso. Os kits ELISA para dosagem das citocinas TNF- α ; IL-1 β ; IL-10 e IL-6 foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, USA).

O ensaio foi feito em placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, Illinois, USA), onde inicialmente foram adicionados 100 μ l/poço do anticorpo de captura, sendo a incubação mantida por 18 horas, a 4°C. Posteriormente o anticorpo de captura foi descartado e a placa foi lavada cinco vezes com PBS/Tween 0,1%. A etapa seguinte consistiu na adição de 200 μ l/poço de solução de bloqueio (PBS/BSA 1%), seguida de incubação por duas horas. Após o bloqueio houve nova etapa de lavagem das placas e 100 μ l de cada amostra e a curva padrão (em 7 diferentes concentrações) foram adicionados à placa. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C e posteriormente lavadas. Em seguida foram adicionados 100 μ l/poço de solução de anticorpo de detecção, biotilado e específico para cada molécula, seguida de incubação de duas horas e uma etapa de lavagem. Transcorrida essa etapa, foram adicionadas a cada placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada, e foi adicionado o tampão substrato contendo Dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) e H₂O₂. Após cerca de 30 minutos, a reação foi interrompida com 50 μ l de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M.

A leitura das placas foi feita utilizando um leitor de placas a 492 nm (Thermo Plate reader). A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente. Sendo que a concentração mínima detectável para cada molécula avaliada foi: IL-1 β , 15.62 pg/ml IL-10, 31.25 pg/ml, IL-6: 31.25 pg/ml e TNF- α : 31.25 pg/ml.

4.8 Avaliação das alterações Histológicas

No 20º dia pós-indução do modelo de EAE, os animais anestesiados foram submetidos ao procedimento de perfusão transcardíaca com 10 mL de salina e posteriormente 10 mL de formol tamponado a 4 %, pH 7,2. As medulas espinhais foram coletadas e rapidamente fixadas em formol tamponado. As amostras de medula foram processadas rotineiramente, incluídas em parafina, e submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos com 4 μ m de espessura.

4.8.1 Hematoxilina e Eosina (H&E)

Para avaliação *in situ* do infiltrado inflamatório, os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. Após desparafinização em dois banhos de xilol, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%) e então lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela Hematoxilina, por 10 minutos e lavados em água corrente, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado (100 mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e novamente lavados em água corrente para evitar acidificação excessiva. Posteriormente, foram corados pela Eosina, por 30 segundos. Após a última lavagem em água corrente, foram desidratados, em 2 banhos de álcool absoluto e levados à estufa a 56°C para secagem e posterior montagem com lamínula e Entellan.

4.8.2 Quantificação das imagens

Para avaliação do infiltrado inflamatório, todos os núcleos celulares presentes foram quantificados em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) para a quantificação. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmara Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B e todas as imagens foram analisadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, CA) e apresentados com média \pm SEM. Para todas as variáveis foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Em se tratando do peso corporal e o escore clínico, utilizou-se o teste Two-away ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. A correlação entre as variáveis peso e escore foi avaliada considerando o coeficiente de Spearman.

Na avaliação da permeabilidade vascular do cérebro, pulmão, medula e baço e nas análises referentes as citocinas inflamatórias realizados pelo ELISA foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, conforme especificado nas legendas dos gráficos.

Para avaliação dos dados relacionados ao rolamento e adesão leucocitária na medula espinhal foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Com relação aos dados referentes as análises histológicas utilizou-se o teste One-way ANOVA, seguido pelo-pós teste de Tukey.

Para avaliar se houve diferença significativa entre os grupos, foi considerado o nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.1 Escore clínico e peso corporal

Para avaliar o efeito da nebulização com Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas no desenvolvimento clínico da EAE, o escore clínico e peso corporal foram monitorados até o vigésimo dia após a indução da doença.

Em relação aos sinais clínicos característicos do modelo pode-se observar que o início dos sintomas foi evidenciado no dia 6 em todos os grupos doentes, apresentando um aumento abrupto do escore clínico a partir do 12º dia pós indução da doença. Nossos resultados também evidenciaram que os todos os grupos EAE (doentes) apresentaram diferença estatística com os grupos controles no 15º, 18º e 20º dias após indução da doença. Por outro lado, vale ressaltar que os animais submetidos a administração inalatória de Ang-(1-7) encapsuladas por lipossomas apresentaram um menor escore clínico quando comparado com os demais grupos EAE, havendo diferença estatisticamente significativa nos dias 15, 18 e 20 quando comparado com o grupo EAE ($p < 0.05$, $p < 0.001$ e $p < 0.001$, respectivamente), EAE + lipo ($p < 0.001$, $p < 0.001$ e $p < 0.001$, respectivamente) e EAE + Ang-(1-7) ($p < 0.001$, $p < 0.001$ e $p < 0.001$, respectivamente). Os grupos controles não apresentaram diferença estatísticas entre si, ao mesmo tempo que o grupo EAE + Ang-(1-7) não apresentou diferença estatística quando comparada com o grupo doente sem tratamento e com o grupo doente tratado com lipossomas puros.(Figura 7A).

Com relação ao peso corporal dos animais, podemos evidenciar que os animais tratados com Ang-(1-7) associada a lipossomas possuíram a menor perda de peso quando comparado com os animais do grupo EAE sem tratamento no 18º e 20º dias ($p < 0.001$, $p < 0.05$, respectivamente), com os animais EAE tratados com lipossomas vazios no 15º, 18º e 20º dias ($p < 0.001$, $p < 0.001$ e $p < 0.001$, respectivamente), e com os animais submetidos a administração inalatória de Ang-(1-7) no 15º, 18º e 20º dias ($p < 0.01$, $p < 0.001$ e $p < 0.01$, respectivamente). Não houve diferença estatística significativa entre os demais grupos doentes, assim como entre os grupos controles (Figura 7B). Todos os grupos compostos por animais com EAE apresentaram diferença estatística com todos os grupos controles em diversos dias ao longo do experimento, sendo essas diferenças detalhadas de forma mais específica na tabela 4.

Tabela 4: Diferenças estatísticas dos pesos corporais entre os grupos doentes (EAE) e controles (saudáveis).

Grupos Experimentais	EAE	EAE + lipo	EAE + Ang-(1-7)	EAE + lipo + Ang-(1-7)
CTRL	3° (p <0.05)	3° (p <0.05)	3° (p <0.01)	3° (p <0.01)
	15° (p <0.001)	12° (p <0.01)	12° (p <0.01)	6° (p <0.05)
	18° (p <0.001)	15° (p <0.001)	15° (p <0.001)	15° (p <0.001)
	20° (p <0.001)	18° (p <0.001)	18° (p <0.001)	18° (p <0.001)
		20° (p <0.001)	20° (p <0.001)	20° (p <0.001)
CTRL + lipo	3° (p <0.01)	3° (p <0.01)	3° (p <0.001)	3° (p <0.001)
	15° (p <0.001)	12° (p <0.01)	6° (p <0.05)	16° (p <0.01)
	18° (p <0.001)	15° (p <0.001)	12° (p <0.01)	15° (p <0.001)
	20° (p <0.001)	18° (p <0.001)	15° (p <0.001)	18° (p <0.001)
		20° (p <0.001)	18° (p <0.001)	20° (p <0.001)
		20° (p <0.001)		
CTRL + Ang-(1-7)	3° (p <0.01)	3° (p <0.01)	3° (p <0.01)	3° (p <0.001)
	6° (p <0.05)	12° (p <0.001)	6° (p <0.05)	6° (p <0.01)
	12° (p <0.05)	15° (p <0.001)	12° (p <0.001)	12° (p <0.05)
	15° (p <0.001)	18° (p <0.001)	15° (p <0.001)	15° (p <0.001)
	18° (p <0.001)	20° (p <0.001)	18° (p <0.001)	18° (p <0.001)
	20° (p <0.001)		20° (p <0.001)	20° (p <0.001)
CTRL + lipo Ang-(1-7)	3° (p <0.01)	3° (p <0.01)	3° (p <0.001)	3° (p <0.001)
	15° (p <0.001)	12° (p <0.01)	12° (p <0.01)	6° (p <0.05)
	18° (p <0.001)	15° (p <0.001)	15° (p <0.001)	15° (p <0.001)
	20° (p <0.001)	18° (p <0.001)	18° (p <0.001)	18° (p <0.001)
		20° (p <0.001)	20° (p <0.001)	20° (p <0.001)

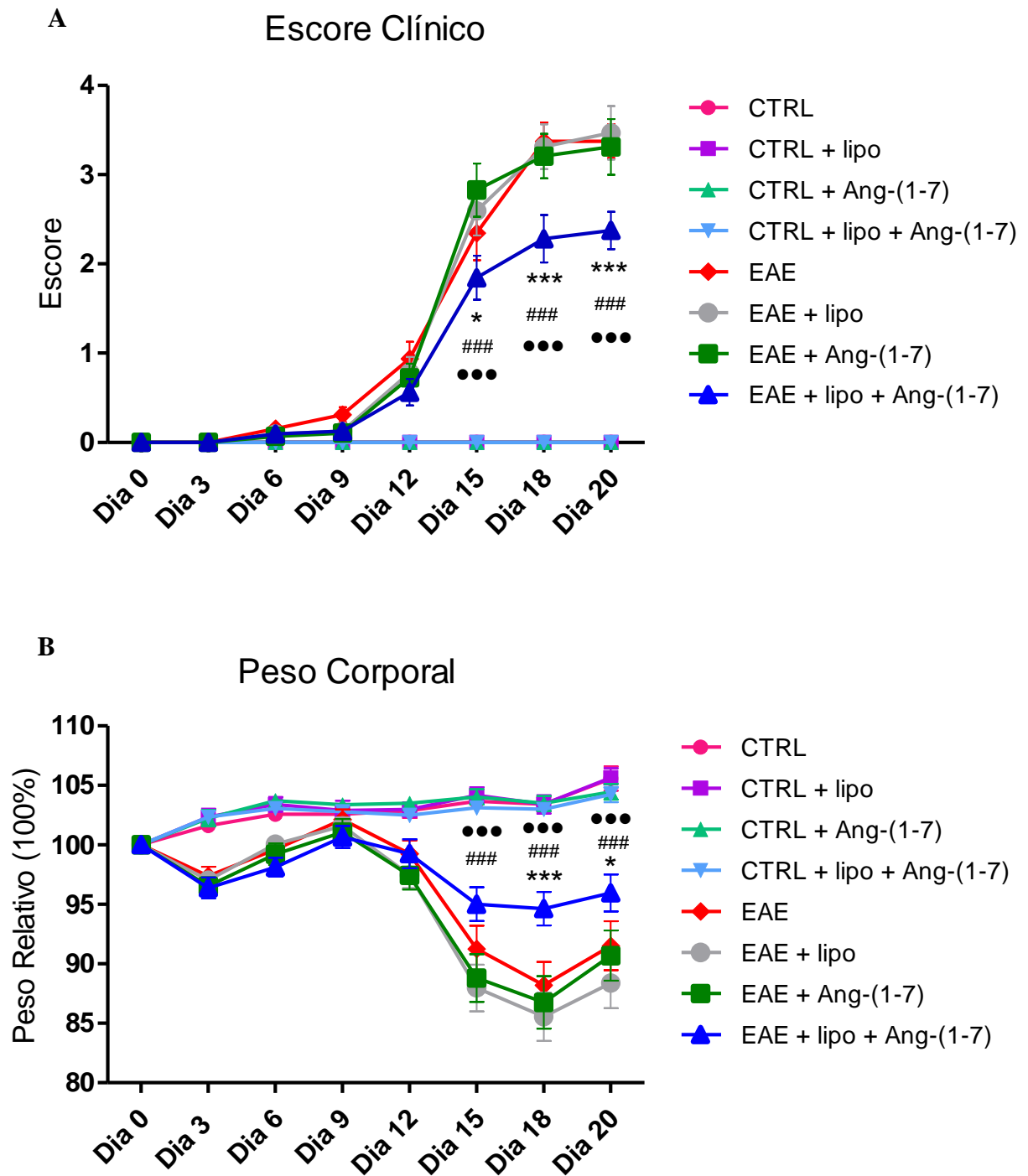


Figura 7: Análise da evolução clínica dos animais. (A) Avaliação do peso corporal e do (B) escore clínico, a cada 72 horas ao longo de 20 dias, dos animais pertencentes ao grupos CTRL (n=29), CTRL + lipo (n=29), CTRL + Ang-(1-7) (n=30), CTRL + lipo + Ang-(1-7) (n=30), EAE (n=32), EAE + lipo (n=32), EAE + Ang-(1-7) (n=29), EAE + lipo + Ang-(1-7) (n=32). Foi utilizado o teste Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Dados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. * diferença significativa entre EAE naive e EAE + lipo + ang. # diferença significativa entre EAE + lipo e EAE + lipo + Ang-(1-7). • diferença significativa entre EAE + Ang-(1-7) e EAE + lipo + Ang-(1-7).

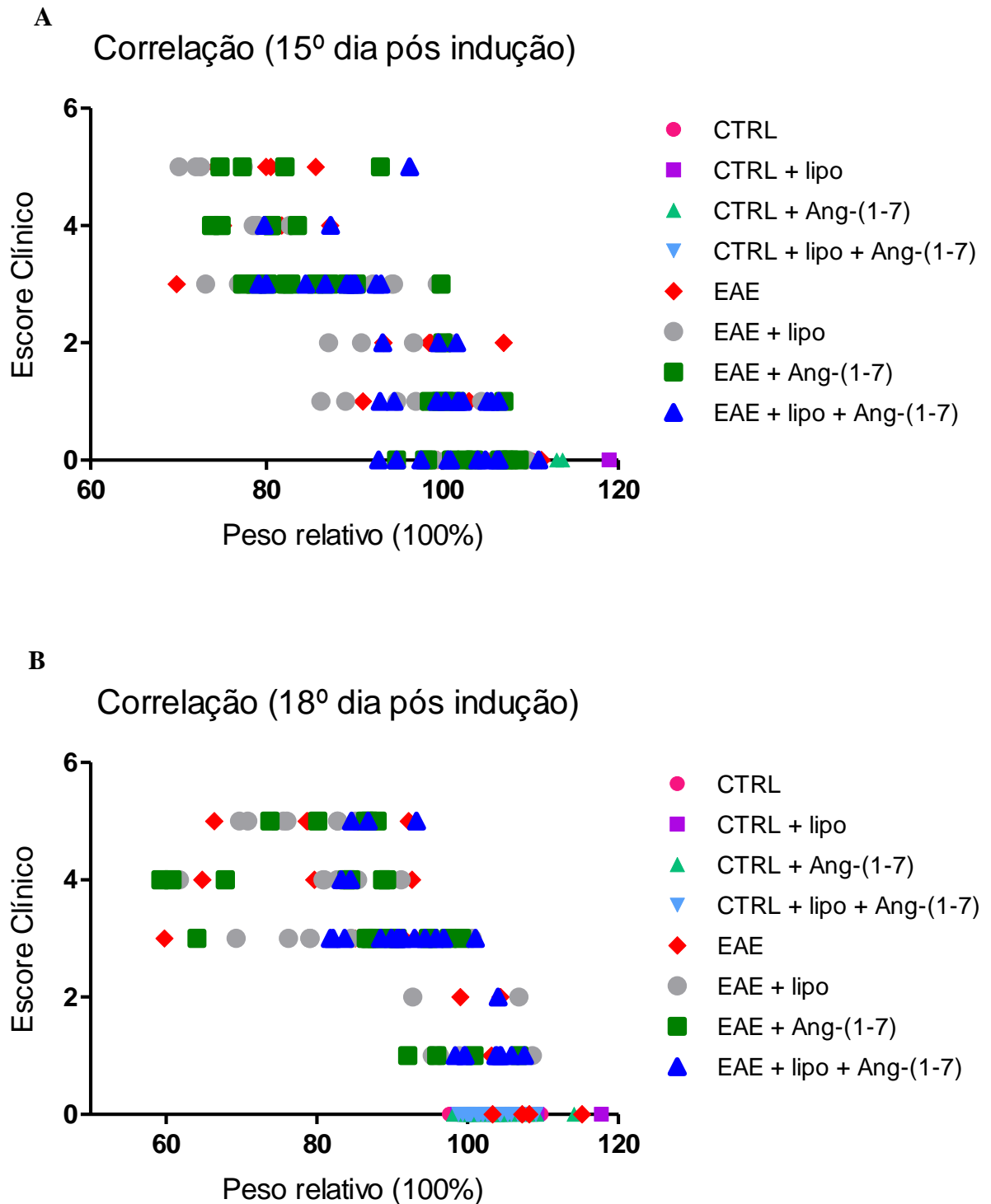


Figura 8: Análise da correlação entre o escore clínico e o peso corporal relativo. (A) Correlação utilizando os dados obtidos no 15^o dia e (B) no 18^o dia após indução dos grupos CTRL (n=29), CTRL + lipo (n=29), CTRL + Ang-(1-7) (n=30), CTRL + lipo + Ang-(1-7) (n=30), EAE (n=32), EAE + lipo (n=32), EAE + Ang-(1-7) (n=29) EAE + lipo + Ang-(1-7) (n=32). A correlação entre as variáveis peso e escore foi avaliada considerando o coeficiente de Spearman.

5.4 Avaliação da permeabilidade vascular do cérebro, medula, pulmão e baço

Para avaliar a permeabilidade vascular dos órgãos e, conseqüentemente, analisar de forma indireta o processo inflamatório tanto central quanto sistêmico, foi realizada a retirada do cérebro, medula espinhal, pulmão e baço dos animais. Com relação a permeabilidade vascular cerebral, observamos que os animais EAE submetidos a administração inalatória de Ang-(1-7) encapsulado em lipossomas apresentaram redução da permeabilidade vascular quando comparado com os animais EAE sem tratamento ($p < 0,05$). Por sua vez o grupo EAE obteve aumento da permeabilidade vascular quando comparado com os grupos controle ($p < 0,01$), controle + lipo ($p < 0,01$), controle + Ang-(1-7) ($p < 0,001$) e controle + lipo + Ang-(1-7) ($p < 0,001$), não apresentando diferença com os grupos doentes tratados com lipossomas puros ou tratados apenas com Ang-(1-7) (Figura 9A). Em se tratando da permeabilidade vascular da medula espinhal, pode-se evidenciar que o grupo EAE apenas apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). Por sua vez, o grupo EAE tratado com lipossomas puros apresentou diferença significativa com o grupo CTRL ($p < 0,01$), CTRL + lipo ($p < 0,01$), CTRL + Ang-(1-7) ($p < 0,01$) e CTRL + lipo + Ang-(1-7) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os demais grupos experimentais (Figura 9B).

No pulmão, nossos resultados revelaram pela primeira vez que os animais EAE sem tratamento apresentaram aumento da permeabilidade vascular e que a administração de Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas foi capaz de reduzir tal efeito ($p < 0,001$). Entretanto, os animais pertencentes ao grupo EAE + lipo apresentaram a mesma resposta pulmonar do grupo alvo do nosso estudo ($p < 0,001$). Os animais EAE submetidos a administração inalatória apenas de Ang-(1-7) puras apresentaram diferença estatística tanto quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) e EAE + lipo ($p < 0,01$), quanto quando comparado com o grupo EAE + lipo + Ang-(1-7) ($p < 0,001$). O grupo doente sem tratamento foi diferente dos grupos CTRL, CTRL + lipo, CTRL + Ang-(1-7) e CTRL + lipo + Ang-(1-7) ($p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 9C). Não houve diferença estatística na permeabilidade vascular do baço entre os grupos (Figura 9D). Ao comparar todos os grupos controles entre si, não foi evidenciado diferenças estatisticamente significativas na permeabilidade vascular do cérebro, medula espinhal, pulmão e baço.

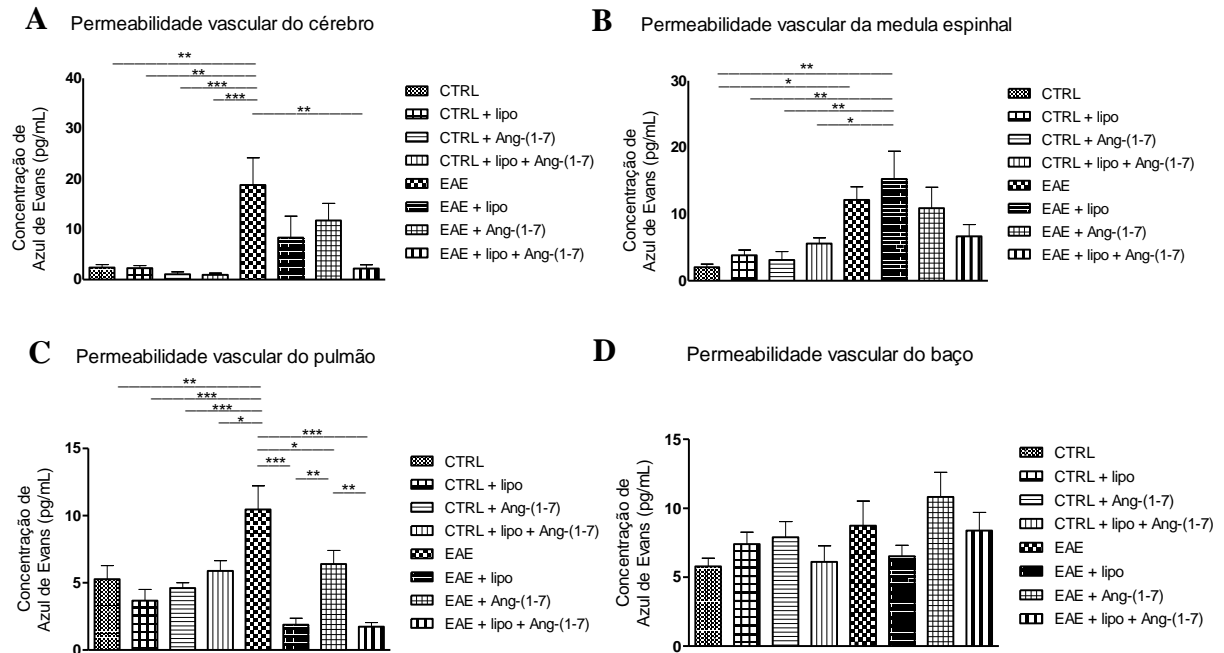


Figura 9: Análise da permeabilidade vascular do cérebro, medula espinhal, pulmão e baço por quantificação por espectrometria da concentração de azul de Evans extravasado para o parênquima tecidual. (A) Permeabilidade vascular cerebral dos grupos CTRL (n=9), CTRL + lipo (n=9), CTRL + Ang-(1-7) (n=8), CTRL + lipo + Ang-(1-7) (n=8), EAE (n=10), EAE + lipo (n=8), EAE + Ang-(1-7) (n=8) e EAE + lipo + Ang-(1-7) (n=9). (B) Permeabilidade vascular da medula espinhal dos grupos CTRL (n=6), CTRL + lipo (n=7), CTRL Ang-(1-7) (n=6), CTRL + lipo + Ang-(1-7) (n=6), EAE (n=5), EAE + lipo (n=6), EAE + Ang-(1-7) (n=6) e EAE + lipo + Ang-(1-7) (n=6). (C) Permeabilidade vascular pulmonar dos animais pertencentes aos grupos CTRL (n=6), CTRL + lipo (n=8), CTRL Ang-(1-7) (n=9), CTRL + lipo + Ang-(1-7) (n=6), EAE (n=7), EAE + lipo (n=10), EAE + Ang-(1-7) (n=10) e EAE + lipo + Ang-(1-7) (n=). (D) Permeabilidade vascular do baço dos grupos CTRL (n=11), CTRL + lipo (n=8), CTRL Ang-(1-7) (n=10), CTRL + lipo + Ang-(1-7) (n=9), EAE (n=12), EAE + lipo (n=11), EAE + Ang-(1-7) (n=12) e EAE + lipo + Ang-(1-7) (n=9). Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey. Dados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

5.5 Avaliação da adesão e rolamento leucocitário na microvasculatura medular

Para avaliação das interações leucócito-endotélio *in vivo* na microvasculatura medular, no 20º dia após indução (20º d.p.i.), os animais dos grupos controles e EAE foram submetidos a cirurgia de laminectomia para retirada das vértebras torácicas, seguida de uma injeção intra-plexo orbital do fluorocromo rodamina 6G, com o objetivo de visualizar o recrutamento leucocitário através da técnica de microscopia intravital. Ao visualizar a microcirculação da medula, foram quantificados o número de leucócitos rolando e aderidos tanto na vênula central quanto nas vênulas pós-capilares que drenam o sangue para o vaso central. As quantificações do recrutamento *in vivo* foram feitas ao longo do comprimento do vaso (100 μm), e em vasos cujos diâmetros variavam de 20 a 60 μm .

Nossos resultados evidenciaram que os animais doentes submetidos a administração inalatória de Ang-(1-7) encapsulada por lipossomas apresentaram aumento da quantidade de leucócitos rolando no endotélio do vaso central da medula quando comparado com os animais doentes sem tratamento ($p < 0.01$) (Figura 3B). Em se tratando do rolamento e adesão leucocitária, tanto das vênulas pós-capilares quanto dos vasos centrais, todos os animais pertencentes aos grupos doentes apresentaram um aumento significativo quando comparados com os grupos controles ($p < 0.001$) (Figura 10A, 10B, 10C e 10D). Não houve diferença estatísticas entre os demais grupos experimentais. As imagens representativas da microvasculatura medular estão demonstradas na figura 11.

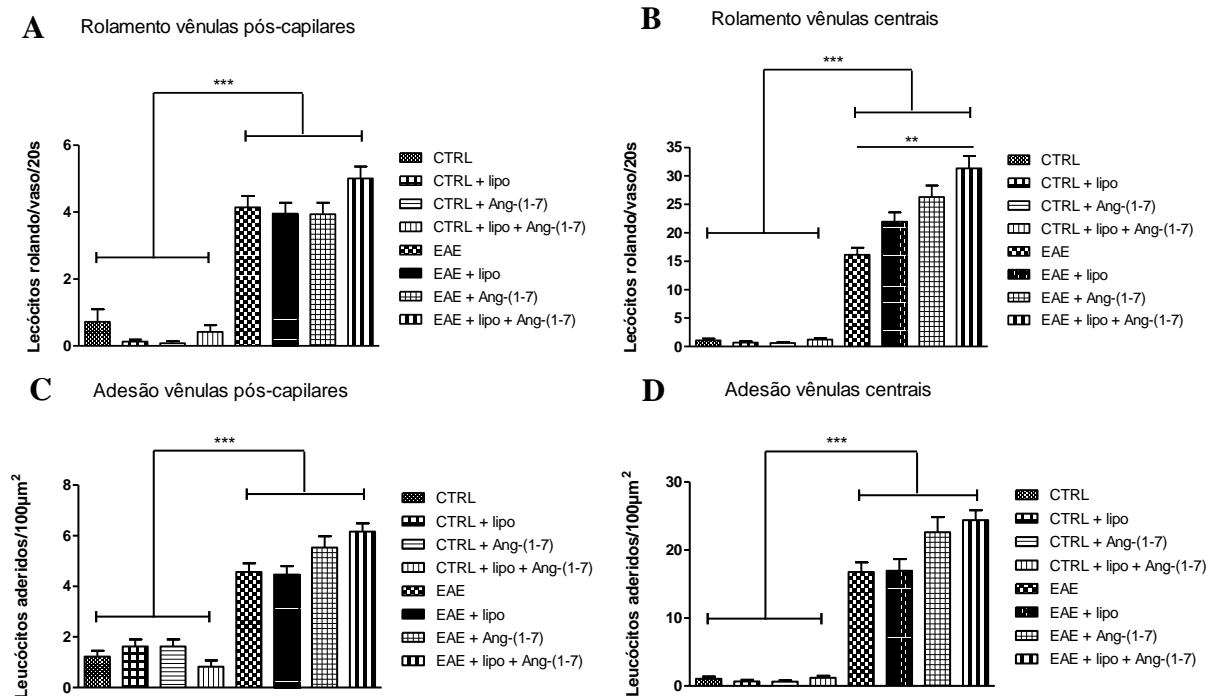


Figura 10: Análise da interação leucócito endotélio na microvasculatura medular. (A) Análise da quantidade de leucócitos rolando nas vênulas pós-capilares da medula espinhal. (B) Análise da quantidade de leucócitos rolando nas vênulas centrais da medula. (C) Análise da quantidade de leucócitos aderidos a cada 100 μ m² do endotélio das vênulas pós-capilares da medula. (D) Análise da quantidade de leucócitos aderidos a cada 100 μ m² de endotélio das vênulas centrais da medula dos grupos CTRL (n=6), CTRL + lipo (n=6), CTRL + Ang-(1-7) (n=6), CTRL + lipo + Ang-(1-7) (n=6), EAE (n=11), EAE + lipo (n=11), EAE + Ang-(1-7) (n=11) e EAE + lipo + Ang-(1-7) (n=12). Foi utilizado o teste One-away ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Dados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

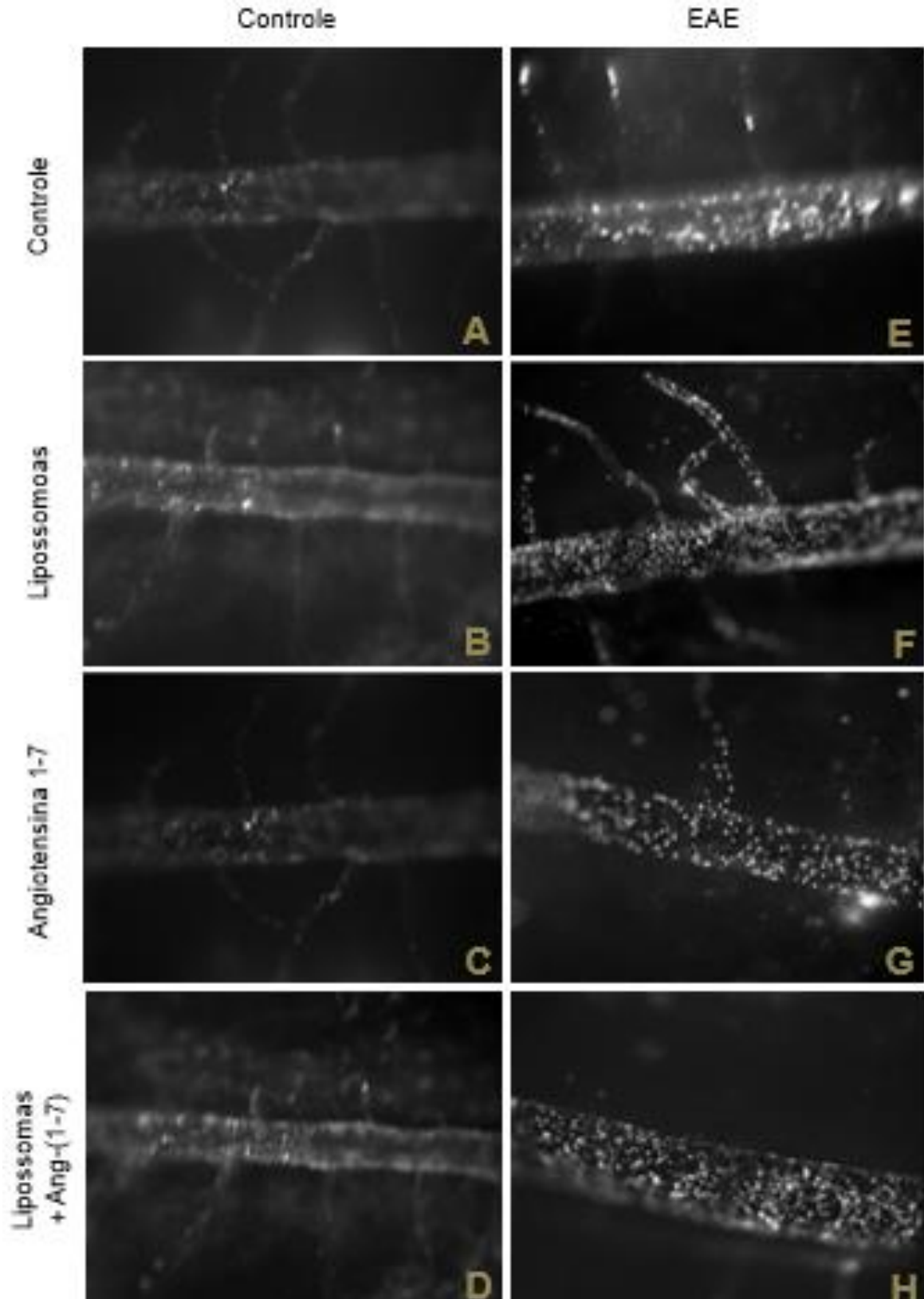


Figura 11: Imagens representativas do recrutamento leucocitário visualizado por microscopia intravital. Os pontos fluorescentes indicam os leucócitos. (Objetiva de 10X). Imagem da microvasculatura da medula espinal dos grupos (A) CTRL, (B) CTRL + lipo, (C) CTRL + Ang-(1-7), (D) CTRL + lipo + Ang-(1-7), (E) EAE, (F) EAE + lipo, (G) EAE + Ang-(1-7) e (H) EAE + lipo + Ang-(1-7).

5.6 Avaliação da concentração de citocinas no cérebro e medula espinhal

Com o objetivo de quantificar as citocinas anti e pró inflamatórias no cérebro e medula espinhal foi realizado a técnica de ELISA no 20º dia pós indução da EAE. Com relação a interleucina anti-inflamatória IL-10, os resultados obtidos demonstraram que os animais pertencentes ao grupo EAE apresentaram redução de sua concentração cerebral quando comparados com o grupo controle + lipo + Ang-(1-7) (Figura 10A). Não houve diferença significativa entre os demais grupos no tecido cerebral ou medular. Entretanto, podemos inferir que o grupo EAE tratado com Ang-(1-7) em lipossomas obteve um aumento tanto da concentração de IL-10 no cérebro, quanto na medula espinhal, quando comparado com os outros grupos doentes (Figura 12A e 12B).

Em se tratando da concentração cerebral da citocina TNF- α , houve apenas um aumento significativo nos animais do grupo EAE + Ang-(1-7) ao serem comparados com os grupos controle que receberam lipossomas puros e com o grupo controle que foi submetido a administração apenas de Ang-(1-7) ($p < 0,05$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 12C). No homogenato de medula espinhal, observou-se que o grupo EAE + lipo + Ang-(1-7) apresentou redução da concentração tecidual desta interleucina quando comparada com o grupo EAE + Ang-(1-7) ($p < 0,05$) (Figura 12D). Não foram observadas alterações significativas nos demais grupos estudados.

Nas análises referentes a interleucina IL-1 β , podemos observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais tanto no cérebro, quanto na medula espinhal (Figura 12E e 12F).

Adicionalmente, nossos resultados revelaram que os animais EAE sem tratamento apresentaram aumento da concentração cerebral de IL-6 quando comparados com os grupos controle ($p < 0,05$), controle tratados com lipossomas puros ($p < 0,01$) e controle tratados apenas com Ang-(1-7) ($p < 0,05$). Entretanto, o grupo que recebeu Ang-(1-7) encapsuladas em lipossomas possuiu uma redução da concentração de IL-6 ao ser comparado com o grupo EAE sem tratamento (Figura 12G). Não houve diferença estatística da concentração desta mesma citocina ao avaliar o parênquima medular (Figura 12H).

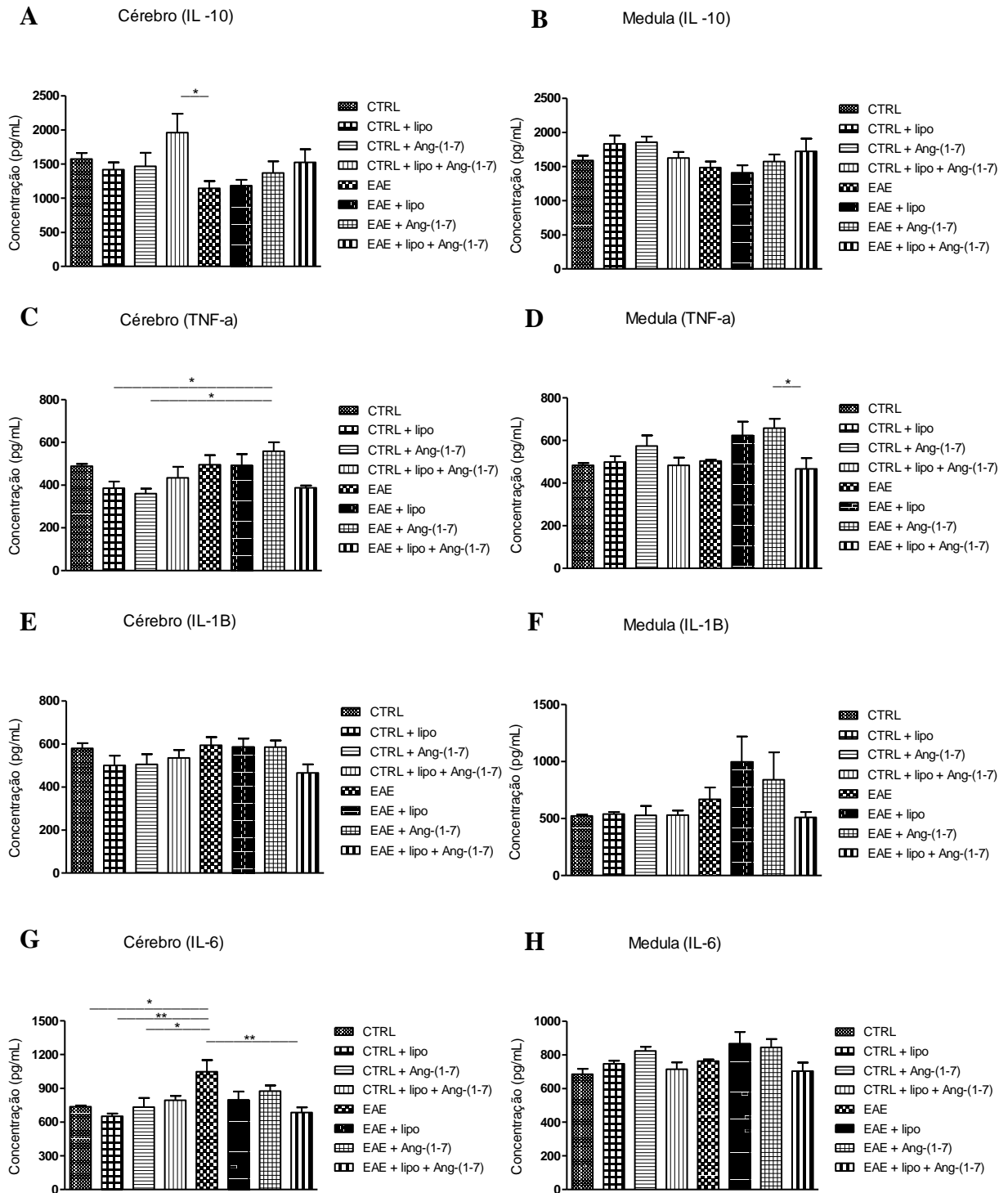


Figura 12: Análise da concentração das citocinas inflamatórias no cérebro e medula espinal através do ELISA. (A) Avaliação da concentração da interleucina IL-10 no tecido cerebral e (B) medular. (C) Avaliação da concentração da interleucina TNF- α no tecido cerebral e (D) medular. (E) Avaliação da concentração da interleucina IL-1 β no tecido cerebral e (F) medular. (G) Avaliação da concentração da interleucina IL-6 no tecido cerebral e (H) medular dos grupos CTRL (n=4), CTRL + lipo (n=4), CTRL + Ang-(1-7) (n=4), CTRL + lipo + Ang-(1-7) (n=4), EAE (n=4), EAE + lipo (n=4), EAE + Ang-(1-7) (n=4) EAE + lipo + Ang-(1-7) (n=4). Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média \pm SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01 e *** p < 0.001.

Nossos resultados sugerem, que mesmo na ausência de diferenças estatísticas em todas as análises avaliadas, que o grupo alvo deste estudo (EAE + Ang-(1-7) + lipossoma) apresenta uma tendência em reduzir a concentração cerebral e medular de citocinas pró-inflamatórias ao mesmo tempo que possui, também de forma tendenciosa, um aumento da concentração de interleucinas anti-inflamatórias, quando comparada com os demais grupos doentes.

5.7 Avaliação do infiltrado inflamatório medular

A quantificação das alterações histopatológicas associadas ao processo inflamatório da medula espinhal foi realizada, mediante quantificação do infiltrado celular na medula, no 20º dia após a indução da EAE, através da técnica de coloração por Hematoxilina-Eosina. Como todos os animais do grupo controle não apresentaram diferenças durante o processo de análise das imagens, apenas os animais pertencentes ao grupo controle submetido a administração de salina foi selecionado para a quantificação dos núcleos celulares.

Nossos resultados evidenciaram que os animais do grupo EAE, EAE + lipo, EAE + Ang-(1-7) e EAE + lipo + Ang-(1-7) apresentaram um aumento do infiltrado inflamatório, principalmente perivascular, quando comparados com o grupo controle ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, respectivamente). Entretanto a avaliação morfométrica do processo inflamatório não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos EAE (Figura 13). As fotomicrografias das medulas espinhais dos grupos experimentais podem ser visualizadas na figura 14.

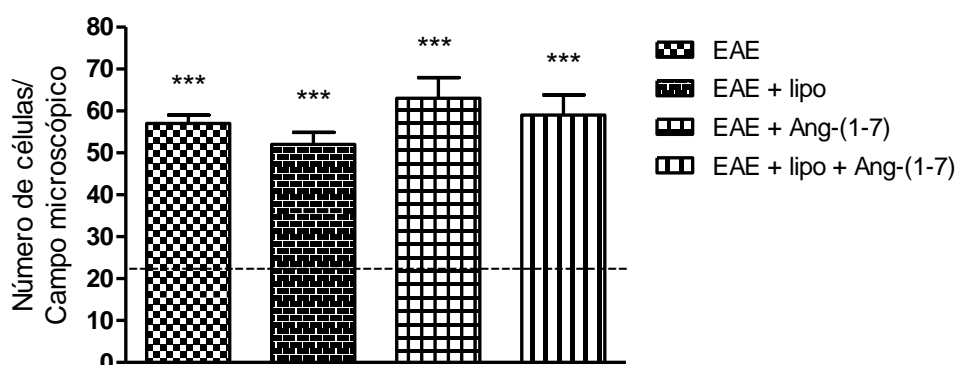


Figura 13: Análise do processo inflamatório medular pela técnica de H&E Quantificação do processo inflamatório na medula espinhal dos grupos EAE (n=3), EAE + lipo (n=3), EAE + Ang-(1-7) (n=3) e EAE + lipo + Ang(1-7) (n=3). A linha tracejada representa o número médio de núcleos observados nos animais pertencentes aos grupos controle (n=3). Foi utilizado o teste One-away ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

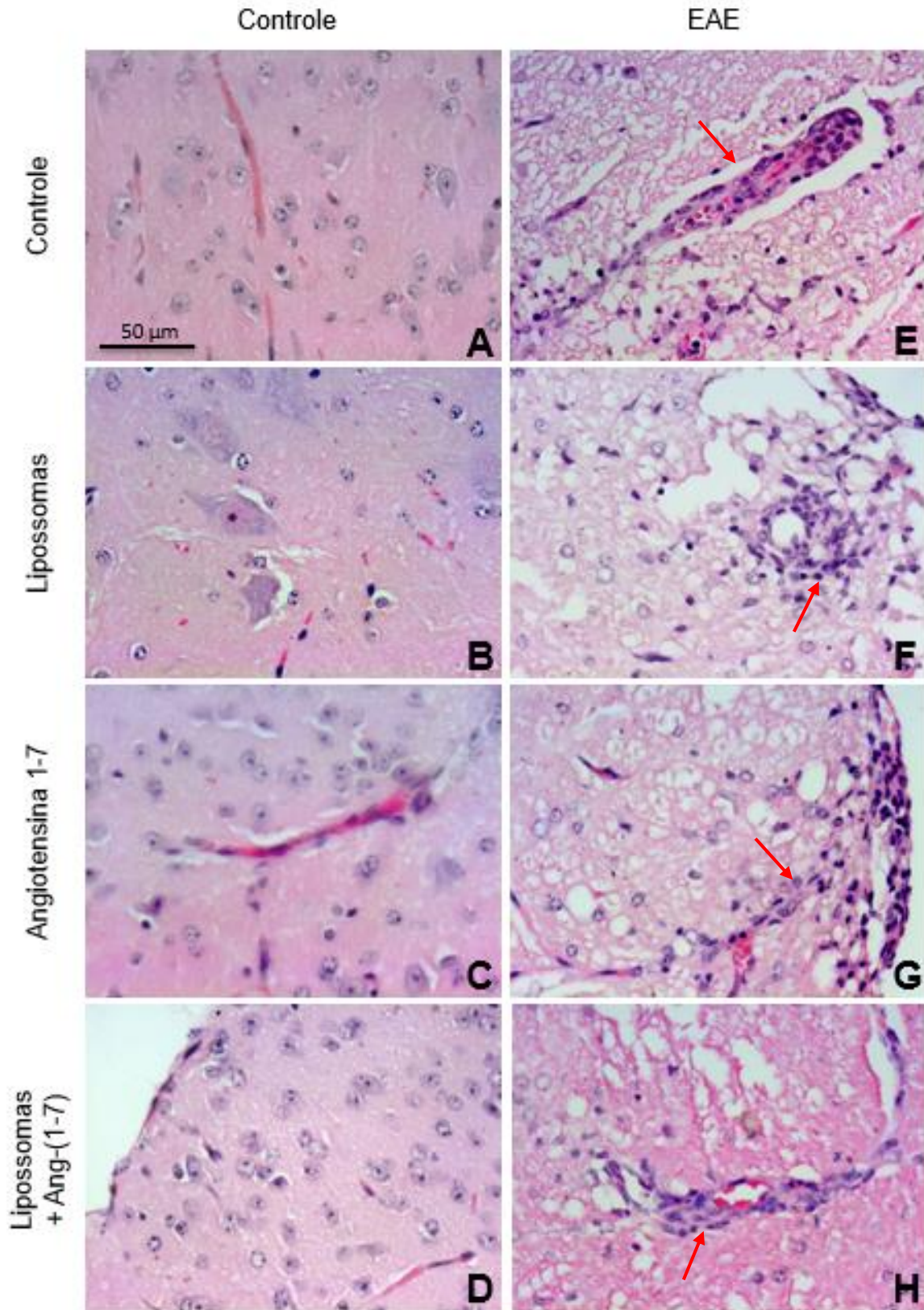


Figura 14: Fotomicrografias da medula espinhal dos grupos experimentais. Fotomicrografias do parênquima medular dos grupos (A) CTRL, (B) CTRL + lipo, (C) CTRL + Ang-(1-7), (D) CTRL + lipo + Ang-(1-7), (E) EAE, (F) EAE + lipo, (G) EAE + Ang-(1-7) e (H) CTRL + lipo + Ang-(1-7). Em A, B, C e D observa-se quadro de normalidade; em E, F, G e H observa-se infiltrado inflamatório perivascular (setas vermelhas). Hematoxilina Eosina, barra=50 μ m.

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neurológica crônica, imprevisível, autoimune, que se caracteriza pela destruição da bainha de mielina mediada por células T CD4⁺ e CD8⁺ autorreativas. A doença é caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório, desmielinização e dano axonal, levando a disfunção neurológica progressiva e incapacidade física permanente. Sendo assim, é inquestionável o efeito dos déficits neurológicos advindos da progressão da EM causando impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (SUNG *et al.*, 2013). Atualmente, a doença não tem cura, mas existe uma grande diversidade de fármacos utilizados para o tratamento da EM, que visam controlar os sintomas, tratar os surtos, e modificar o curso da doença, desacelerando sua progressão. Embora esses medicamentos objetivem atenuar os efeitos da EM e melhorar o conforto e qualidade de vida dos pacientes, muitos destes fármacos se apresentam como agentes imunomoduladores e imunossupressores, cuja administração a longo prazo resulta em supressão inespecífica da função imunológica, aumentando os riscos de infecções (leucoencefalopatia multifocal progressiva), tumores, reações alérgicas, além de dor, fadiga e hepatotoxicidade (PARDO & JONES, 2017; TILLERY *et al.*, 2018; MAAROUF *et al.*, 2018; FAISSNER & GOLD, 2018). Nesse estudo, investigamos o efeito da administração inalatória de lipossomas contendo o heptapeptídeo Ang-(1-7), sobre a resposta neuroinflamatória associada ao modelo experimental da EM, conhecido como EAE.

Os nanocarreadores, como os lipossomas, são uma ferramenta eficaz para a entrega direcionada de drogas para um determinado alvo, apresentando como vantagens, não só a possibilidade de aumento da estabilidade do medicamento, e a ausência de biotoxicidade, mas também a alta permeabilidade pela membrana celular (JOURGHANIAN *et al.*, 2016; VYAS & KHAR, 2007). Os lipossomas são a primeira geração de nanocarreadores de drogas e consistem em uma estrutura concêntrica formada por uma ou mais bicamadas lipídicas separadas por compartimentos aquosos (LAWRENCE & REES, 2000; FERNANDES *et al.*, 2018; FONTES *et al.*, 2018). Os lipossomas utilizados nesse estudo apresentaram um diâmetro médio de 133,0 nm e um PDI menor que 0,3. Trabalho recente da literatura teve como foco o preparo de nanopartículas lipídicas sólidas contendo o fármaco dimetil fumarato, com o intuito de potencializar sua ação farmacológica (OJHA & KUMAR, 2018). Corroborando com nossos resultados, as nanopartículas formuladas naquele estudo apresentaram o mesmo PDI que o lipossoma utilizado no nosso trabalho. O PDI é um

parâmetro que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos. Um PDI abaixo de 0,3, indica a formação de sistemas monodispersos. Por outro lado, o diâmetro médio da partícula sintetizada no estudo de OJHA & KUMAR, (2018) foi da ordem de 300,0 nm, bem maior que o tamanho do lipossoma utilizado nesse estudo (133,0 nm). O diâmetro médio das nanopartículas tende a variar em função do tipo de nanocarreador lipídico utilizado (NEMEN & LEMOS-SENN, 2011). Além disso, sintetizar um lipossoma menor se justifica, uma vez que diferentemente do estudo do grupo de OJHA (2018), o qual utilizou a administração oral das nanopartículas em ratos, no nosso estudo foi feita a nebulização dos lipossomas em camundongos. Apesar de estar bastante elucidado na literatura os benefícios relacionados ao uso dos lipossomas (TAPEINOS *et al.*, 2017; FONTES *et al.*, 2018), existem poucos estudos abordando a administração de Ang-(1-7) associada a essas nanoestruturas (SILVA-BARCELLOS *et al.*, 2001; SILVA-BARCELLOS *et al.*, 2004; MÁRQUEZ-MIRANDA *et al.*, 2017).

A EM pode apresentar variações em sua apresentação clínica, desde quadros silenciosos até as formas mais severas e sintomáticas. Em contexto de recidivas graves, caracterizado com perda de visão, fraqueza muscular severa e/ou desequilíbrio, os quais interferem na mobilidade, segurança ou capacidade funcional do paciente, a maioria dos neurologistas recomenda o tratamento com corticosteroides (POSSA *et al.*, 2017). O esquema de tratamento mais comum é a administração endovenosa de altas doses de corticosteroides, durante três a cinco dias, para reduzir a inflamação e acabar com a recidiva mais rapidamente (National Multiple Sclerosis Society, 2018). Atualmente, existem dezesseis fármacos disponibilizados para o tratamento da EM, sendo que desse total, treze são administrados por via endovenosa ou por infusão. Assim, a forma inconveniente de administração associada aos efeitos adversos relacionados ao uso dos fármacos, dificulta a adesão e/ou continuidade ao tratamento por parte do paciente (GLANZ *et al.*, 2014; SCOLDING *et al.*, 2017).

Nesse trabalho, a via de administração dos lipossomas contendo Ang-(1-7), foi a via nasal mediante nebulização. Recentemente, a via nasal tem recebido maior atenção quando comparado com as vias orais e parenterais. Primeiramente, a mucosa nasal é altamente vascularizada e imunogênica permitindo rápida absorção e início de ação do fármaco. Segundo, essa via permite a entrega do medicamento diretamente para o SNC, sem necessariamente, ter que atravessar a BHE, reduzindo,

dessa forma, os efeitos colaterais sistêmicos. (ILLUM, 2012; KUMAR *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2017). O método pioneiro de administração intranasal para entrega de fármaco no SNC foi descrito pela primeira vez por FREY em 1991. Segundo BARTUS e colaboradores (2004), em estudo pré-clínico realizado em modelos animais de DP, a levodopa, quando inalada, retardou o declínio da função motora ao ser comparada com a administração oral. Além disso, a inalação do fármaco foi eficaz em uma dose menor do que a formulação oral.

Após vinte dias de monitoramento da progressão clínica da EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57Bl/6J, observou-se que a administração, por nebulização, de lipossomas contendo Ang-(1-7) foi capaz de amenizar os sinais clínicos da doença, além de diminuir a perda de peso atribuída a esse modelo. O papel da Ang-(1-7) já foi elucidado em modelos de outras doenças neurológicas como modelos de isquemia/hemorragia cerebral. Nesse contexto, foi observado que a administração de Ang-(1-7) foi capaz de atenuar a severidade da doença, embora, na grande parte destes estudos, a via de administração utilizada foi a i.c.v (MECCA *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2014; REGENHARDT *et al.*, 2014; BENNION *et al.*, 2018).

Inúmeros estudos relataram a associação entre SRA cerebral e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (MOGI & HORIUCHI, 2013; SAAVEDRA *et al.*, 2016; ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2017). Segundo GUO e colaboradores (2017), animais com EAE apresentaram um aumento significativo da concentração de Ang II no soro. A Ang II é capaz de induzir a ativação e a migração de células microgliais. (FORRESTER *et al.*, 2018). Além disso, a sinalização mediada pela ativação do receptor AT1 é capaz de ativar a NADPH oxidase, podendo causar estresse oxidativo e morte neuronal associada às doenças neurodegenerativas (GIRONACCI *et al.*, 2018). Associada a esse mecanismo, a Ang II aumenta diretamente o estresse oxidativo celular e mitocondrial, proporciona a ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, e promove o aumento da produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6, e quimiocinas como a MCP-1, resultando em resposta inflamatória significativa e apoptose celular (GIRONACCI *et al.*, 2018; FORRESTER *et al.*, 2018). Estudo prévio, também demonstrou que o bloqueio de ECA e AT1 suprime células Th1 e Th17 autorreativas, promove células Tregs CD4⁺ FoxP3⁺ antígeno-específicas, e inibe a via inflamatória de NF- κ B (PLATTEN *et al.*, 2009). Com relação a Ang 1-7, ainda não foram bem elucidados sua função e mecanismo de ação em doenças neurodegenerativas, como a EAE (GOLDSTEIN *et*

al., 2016). No entanto, sabe-se que o receptor Mas, quando ativado pela Ang-(1-7), sofre dimerização, sendo capaz de inibir o receptor AT1. Por sua vez, a inibição do receptor AT1 aumenta a expressão de ECA 2, Ang-(1-7) e do receptor Mas com redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e aumento da citocina anti-inflamatória, IL-10 (SIMÕES E SILVA *et al.*, 2013). Além disso, a Ang-(1-7) é capaz de reduzir a liberação do ânion superóxido, apresentando efeitos antioxidantes (KHAJAH *et al.*, 2017).

Por sua vez, a administração inalatória de Ang-(1-7) não encapsulada em lipossomas, não atenuou o escore clínico e a perda de peso dos animais com EAE. Segundo, IUSUF *et al.*, (2008), esse peptídeo possui um curto tempo de meia-vida, correspondendo a 20 segundos e 30 minutos quando administrado de forma intravenosa em roedores e humanos, respectivamente, sendo rapidamente metabolizado pelo organismo. Além disso, a baixa lipossolubilidade associada a baixa capacidade de atravessar barreiras fisiológicas, limita o uso de peptídeos para o tratamento de diversas condições patológicas, sendo necessário o desenvolvimento e uso de estratégias de direcionamento de fármacos (MÁRQUEZ-MIRANDA *et al.*, 2017), como os lipossomas utilizados no nosso trabalho.

O presente trabalho evidenciou, tanto no 15^o quanto no 18^o dias pós indução da doença, uma correlação negativa entre o peso corporal e o escore clínico dos animais, demonstrando que quanto maior o escore clínico menor o peso dos camundongos em ambos os dias de análise. O início da doença é tipicamente correlacionado com uma redução do peso que pode começar entre 1 a 2 dias antes que os sintomas da EAE sejam visíveis (BITTNER *et al.*, 2014). Assim, pode-se inferir que a indução do modelo nesse estudo foi exitosa, uma vez que seguiu os padrões característicos da EAE descritos em trabalhos prévios (DOS SANTOS, *et al.*, 2008; BERNARDES *et al.*, 2016)

No modelo de EAE, a invasão de células T através da BHE consiste em um mecanismo que antecede a manifestação autoimune associada a patologia (SMORODCHENKO *et al.*, 2007). A ativação da micróglia, o infiltrado de macrófagos e a atividade mitocondrial proporcionam o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio no SNC, causando o início de lesões ao longo na BHE (DOPKINS, *et al.*, 2018). Existe uma relação estreita entre a severidade da doença e a ruptura da integridade da BHE levando a um aumento do infiltrado mononuclear no SNC (YANYING, *et al.*, 2007). Sendo assim, alterações na permeabilidade vascular no

sistema nervoso central tem uma forte associação com a disfunção da barreira hematoencefálica. A partir da técnica de mensuração do extravasamento do Azul de Evans no parênquima tecidual, observamos que os animais pertencentes ao grupo EAE não tratados apresentaram aumento da permeabilidade vascular do cérebro e medula espinhal. O provável mecanismo associado à disfunção da integridade da BHE e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade vascular na EM, está relacionado ao dano endotelial mediado em parte pelo aumento de citocinas pró inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-17, IL-22, TNF- α (ALVAREZ *et al.*,2011), sendo evidenciado alterações nas proteínas que constituem as *tight junctions* na vasculatura do SNC de pacientes com EM (BENNETT *et al.*,2010).

De forma interessante, e explicando a melhora clínica, encontrou-se que os animais nebulizados com Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas, apresentaram uma redução da permeabilidade vascular cerebral, ou seja uma preservação da integridade funcional da barreira hematoencefálica. Corroborando com nossos resultados, estudo realizado por WU *et al.*, (2015) demonstrou que a administração icv de Ang-(1-7) em modelos de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) reduziu a permeabilidade da BHE, a qual foi verificada, da mesma forma que no nosso estudo, por meio da técnica de azul de evans. Proteínas como Claudina-5 e ZO-1 são essenciais para manutenção da estrutura e função da BHE. Essas proteínas são capazes de formar *tight junctions*, impedindo a entrada de substâncias através da barreira (CHEN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018). Entretanto, já é sabido que na EM ocorre uma destruição da BHE, aumentando o extravasamento de células inflamatórias para o SNC (CRAMER *et al.*, 2015; DARGAHI *et al.*, 2017). Nesse mesmo estudo realizado por WU *et al.*, (2015) a elevação da expressão gênica dessas proteínas e respectivos RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) foi evidenciada após o tratamento Ang-(1-7), confirmando o efeito protetor deste peptídeo sobre a BHE.

Além da avaliação permeabilidade vascular no SNC, também quantificamos a permeabilidade vascular pulmonar. Diversas pesquisas sugerem que o pulmão pode ser responsável por um papel essencial na autoimunidade (THATI *et al.*, 2015; KUEHL *et al.*, 2017). Segundo ODOARDI (2012), antes da entrada das células T autorreativas no SNC, estas se estabelecem no pulmão, reativam-se e adquirem capacidade de entrar no SNC. O pulmão possui um ambiente imune único que mantém a homeostase do organismo inibindo as respostas inflamatórias exacerbadas contra estímulos externos (KANAYAMA *et al.*, 2015). No entanto, ainda não é completamente

compreendido a atuação do sistema imunológico pulmonar no desenvolvimento do processo inflamatório de caráter autoimune no SNC. Os animais pertencentes ao grupo EAE não tratado apresentaram um aumento da permeabilidade vascular pulmonar. Por sua vez, o tratamento com Ang-(1-7) puras ou associada a lipossomas, reduziu a permeabilidade pulmonar. Já é sabido que esse peptídeo é capaz de atenuar o processo inflamatório pulmonar em diversos modelos que mimetizam patologias pulmonares (ZAMBELLI *et al.*, 2015; MAGALHAES *et al.*, 2018). Nesse aspecto nossos resultados sugerem que, além de atuar diretamente no SNC, a Ang-(1-7) pode ter atuado no pulmão através, por exemplo, da redução do processo inflamatório, ocasionando em menor reativação de células inflamatórias pulmonares e, conseqüentemente, menor resposta autoimune no SNC. Entretanto, para confirmar tal suposição, estudos imunológicos e fisiológicos focados no pulmão devem ser realizados deste modelo de EM.

De forma interessante, a administração inalatória apenas de lipossomas também foi capaz de reduzir a permeabilidade pulmonar nos animais doentes. As nanopartículas utilizadas neste estudo são compostas por três tipos de lipídeos, DSPC, DSPE-PEG2000e CHO, sendo que não foi incorporado nenhuma outra substância a superfície dessa nanoestrutura. Não há evidencia na literatura de estudos demonstrando efeitos protetores pulmonares desses tipos de lipídeos. Dessa forma, estudos futuros devem ser realizados com o intuito de verificar o possível mecanismo de ação desses lipossomas no pulmão.

A Ang-(1-7), por sua vez, é capaz de inibir a via do NF- κ B, causando redução dos níveis de citocinas inflamatórias (BIHL *et al.*, 2015). Segundo JIANG *et al.*, (2012) a infusão de Ang- (1-7) no ventrículo lateral de ratos Sprague-Dawley, submetidos à oclusão permanente da artéria cerebral média, associou-se à diminuição local do estresse oxidativo, supressão da atividade do NF- κ B e à redução da atividade de citocinas pró-inflamatórias. Ao avaliarmos, por ELISA, a concentração das citocinas pró e anti-inflamatórias no cérebro e medula, nossos dados mostram que os animais EAE não tratados apresentaram aumento da concentração da interleucina anti-inflamatória IL-6 no parênquima cerebral, ao mesmo tempo que a administração de Ang-(1-7) possibilitou redução dos níveis teciduais desta interleucina. Corroborando com nossos resultados, alguns estudos demonstraram aumento de IL-6 cerebral em animais EAE, assim como, aumento de TNF- α ; (BERNARDES *et al.*, 2013; LUBINA-DAŃBROWSKA *et al.*, 2017). Com relação ao TNF- α , apenas o grupo EAE + Ang 1-7

apresentou aumento significativo dessa citocina no parênquima cerebral quando comparado com os grupos CTRL + lipo e CTRL + lipo + Ang-(1-7). Por outro lado, uma redução significativa da concentração da interleucina IL-10 apenas foi evidenciada no grupo EAE quando comparada com o grupo CTRL + lipo + Ang-(1-7). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida principalmente por macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e células Treg. A concentração desta citocina apresentar-se reduzida em pacientes com EM (PALLE *et al.*, 2017). Estudos realizados em modelos de EAE demonstraram um importante papel da IL-10 na regulação dos linfócitos Th1 e Th17 (HUBER *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2018). Por sua vez, a Ang-(1-7) possui fortes características cerebroprotetoras (REGENHARDT *et al.*, 2014; GOLDSTEIN *et al.*, 2016; BENNION *et al.*, 2018) e sua associação com lipossomas facilita drasticamente sua entrada ao SNC (AMBHORE *et al.*, 2017), podendo desencadear uma resposta mais exacerbada. Dessa forma, o peptídeo em lipossomas, quando administrado em animais saudáveis, pode predispor ao aumento da resposta anti-inflamatória cerebral, conforme evidenciado em nosso resultado.

O efeito anti-inflamatório da Ang-(1-7) observado pela redução da concentração cerebral de IL-6, também foi evidenciado em estudo realizado com modelos de colite, na qual a administração intraperitoneal de Ang-(1-7) foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos dessa interleucina (KHAJAH *et al.*, 2017). Conforme especificado anteriormente, a Ang-(1-7) ao ativar o receptor Mas, é capaz de atuar na redução de citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-6 (SIMÕES E SILVA *et al.*, 2013; BIHL *et al.*, 2015). O mecanismo de ação exato da Ang-(1-7) em distúrbios neurodegenerativos ainda não é bem elucidado, no entanto, estudo realizado por RABIE *et al.*, (2018) evidenciou pela primeira vez o efeito neuroprotetor de Ang1-7 em modelo de DP mediado em parte pela ativação via Ang-(1-7)/ MAS/ PI3K/ Akt / Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB)/ Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Além disso, Ang-(1-7) foi capaz de inibir o eixo Ang II/AT1, suprimindo a inflamação e o estresse oxidativo.

Sabe-se que hexapeptídeo Ang-(1-7) pode modular negativamente a expressão e liberação de citocinas e também a migração leucocitária (SIMÕES E SILVA *et al.*, 2013). A BHE é uma barreira especial com junções endoteliais de alta integridade, que restringe a entrada de íons, macromoléculas e substâncias nocivas da circulação para o SNC (LI *et al.*, 2018). Em processos neuro-inflamatórios, como a EM e o EAE, a o recrutamento e diapedese dos leucócitos através da barreira

hematoencefálica é essencial para a infiltração no SNC e indução da desmielinização, dano axonal e consequentes sinais clínicos e déficits neurológicos (SAMUS *et al.*, 2018).

A interação leucócito-endotélio *in vivo* tem sido amplamente investigada através da técnica da microscopia intravital. Esse método permite a visualização de processos de rolamento, adesão e, em algumas circunstâncias, transmigração de células do vaso sanguíneo em direção ao tecido (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Na busca pelo entendimento dos mecanismos celulares associados ao atenuado escore clínico dos animais EAE tratados com lipossomas contendo Ang-(1-7), foi realizada uma análise *in vivo* dos eventos de rolamento e adesão na microvasculatura do SNC seguida por análise do grau histológico de infiltração celular. A análise da interação leucócito-endotélio (rolamento e adesão), *in vivo*, foi visualizada na microcirculação da medula através da técnica de microscopia intravital, após marcação dos leucócitos com o fluorocromo rodamina 6G (DOS SANTOS *et al.*, 2008; BERNARDES *et al.*, 2013; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2015). Corroborando dados anteriores do nosso grupo (Bernardes *et al.*, 2013), os animais EAE apresentaram um aumento do rolamento e da adesão leucocitária na microvasculatura medular quando comparados com os grupos controles.

Entretanto, os animais EAE nebulizados com lipossomas contendo Ang-(1-7) não apresentaram redução do rolamento e adesão leucocitária nas vênulas central e pós-capilares da medula. As células Treg apresentam propriedades imunossupressoras sendo capazes de atuar por meio de diversos mecanismos como na produção de citocinas imunomoduladoras (IL-10 e TGF- β) e na expressão de moléculas supressoras (AZIMI *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2018). Esses tipos celulares são capazes de controlar a atividade inflamatória excessiva, suprimindo o desenvolvimento de doenças autoimunes. Estudos demonstram que as células Treg apresentam uma frequência reduzida e prejuízo funcional em pacientes com EM, no entanto, a causa dessas alterações permanece desconhecida (KIMURA *et al.*, 2018; SAMBUCCI *et al.*, 2018). Recente estudo demonstrou através da técnica de citometria de fluxo que a angiotensina II induz a redução de células Treg nos rins e sangue (CHEN X *et al.*, 2018). A Ang-(1-7) por sua vez é capaz neutralizar a ação pró-inflamatória desencadeada pela da Ang II (GIRONACCI *et al.*, 2018). Dessa forma, possivelmente, pode-se inferir que a Ang-(1-7) em lipossomas por ter recrutado uma maior concentração de linfócitos Treg na medula, causando o aumento do rolamento

leucocitário. Além disso, o grupo EAE + lipo + Ang-(1-7) apresentou um aumento de IL-10 medular (interleucina liberada pelas células Treg) quando comparado com os demais grupos doentes, apesar de não haver diferença significativa. Para confirmar tais suposições estudos imunohistoquímicos devem ser realizados com o intuito de averiguar o tipo de leucócito presente na microvasculatura da medula espinhal após o tratamento com Ang-(1-7) em lipossomas.

A fisiopatologia da EM, assim como no modelo de EAE, envolve a migração de células inflamatórias autorreativas para o SNC, desencadeando a neuroinflamação. (HAFLER, 2004; COMABELLA & KHOURY, 2012). De fato, já é bem elucidado na literatura que na EAE induzida por MOG35-55, há um infiltrado celular marcante nas meninges e no parênquima da medula espinhal (KUERTEN *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2017). Como esperado, os animais dos grupos doentes (EAE) apresentaram proeminente infiltrado inflamatório na medula em relação ao grupo controle observada pela técnica histológica de H&E. Entretanto, no grupo EAE submetido a administração inalatória de Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas não foi evidenciado diferença significativa com os demais grupos doentes. Tal resultado pode ter ocorrido provavelmente devido ao pequeno número amostral (3 animais por grupo), sendo necessário novos experimentos histológicos com o intuito de comprovar ou não a efetividade da Ang-(1-7) no processo inflamatório medular.

Em conjunto, os dados apresentados nesse trabalho, sugerem que a nebulização de lipossomas contendo Ang-(1-7) apresenta um potencial terapêutico, uma vez que foi capaz de atenuar o escore clínico e a perda de peso nos animais com EAE, efeitos que podem estar associados a diminuição de parâmetros neuroinflamatórios, tais como como a concentração da interleucina 6 e da permeabilidade vascular cerebral.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra pela primeira vez que animais com encefalomielite autoimune experimental apresentaram uma melhora clínica ao serem submetidos a administração inalatória de Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas. Esses resultados sugerem que, assim como no sistema cardiovascular, a Ang-(1-7) desempenha um importante papel na encefalomielite autoimune experimental, podendo ser um futuro alvo farmacológico para o tratamento da esclerose múltipla. No entanto, são necessários estudos futuros com o intuito de compreender os mecanismos moleculares envolvidos no processo anti-inflamatório e de avaliar os possíveis efeitos adversos relacionados ao uso desse peptídeo em lipossomas

AKHTAR, S.; CHANDRASEKHAR, B.; ATTUR, S.; DHAUNS, G.; YOUSIF, M.; BENTER, I. Transactivation of ErbB Family of Receptor Tyrosine Kinases Is Inhibited by Angiotensin-(1-7) via Its Mas Receptor. **PLoS One**, v. 10, n. 11, e0141657, 2015.

AL-JADERI, Z.; MAGHAZACHI, A. A. Utilization of Dimethyl Fumarete and related molecules for treatment of multiple sclerosis, cancer and other diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 278, p. 1-8, 2016.

AL-KHAMIS, F. A. The use of immune modulating drugs for the treatment of multiple sclerosis. **Neurosciences journal**, v. 21, n. 1, p. 4-9, 2016.

ALMEIDA-SANTOS, A. F.; KANGUSSU, L. M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. The Renin-Angiotensin System and the Neurodegenerative Diseases: A Brief Review. **Protein Pept Lett**, v. 24, n. 9, p. 841-853, 2017.

ALVAREZ, J. I.; CAYROL, R.; PRAT, A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1812, p.252–264, 2011.

AMBHORE, N. S.; RAJU, K. R. S.; MULUKUTLA, S.; YAMJALA, K.; MOHIRE, S.; KARRI, V. V. S. R.; GUPTA, S.; MURTHY, V.; ELANGO, K.. Brain Targeting of 1,9-Pyrazoloanthrone an c-Jun-N-terminal Kinase Inhibitor Using Liposomes for Effective Management of Parkinson's Disease. **Iran J Pharm Res**, v. 16, n. 4, p. 1463-1478, 2017.

AURICCHIO, F.; SCAVONE, C.; CIMMARUTA, D.; DI MAURO, G.; CAPUANO, A.; SPORTIELLO, L.; RAFANIELLO, C. Drugs approved for the treatment of multiple sclerosis: review of their safety profile. **Expert Opin Drug Saf**, v. 16, n. 12, p. 1359-1371, 2017.

AZIMI, M.; GHABAEI, M.; MOGHADASI, A. N.; NOORBAKHSH, F.; IZAD, M. Immunomodulatory function of Treg-derived exosomes is impaired in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Immunol Res**, 2018.

BARTUS, R. T.; EMERICH, D.; SNODGRASS-BELT, P.; FU, K.; SALZBERG-BRENHOUSE, H.; LAFRENIERE, D.; NOVAK, L.; LO, E. S.; COOPER, T.; BASILE, A. S. A pulmonary formulation of L-dopa enhances its effectiveness in a rat model of Parkinson's disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 310, n. 2, p. 828-835, 2004.

BENNETT, J.; BASIVIREDDY, J.; KOLLAR, A.; BIRON, K. E.; REICKMANN, P.; JEFFERIES, W. A.; MCQUAID, S. Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. **J Neuroimmunol**, v. 229, n. 1-2, p. 180-191, 2010.

BENNION, D. M.; HALTIGAN, E.; IRWIN, A. J.; DONNAGELO, L. L.; REGENHARDT, R. W.; PIOQUINTO, D.; PURICH, D.; SUMNERS, C. Activation of the neuroprotective angiotensin converting enzyme 2 in rat ischemic stroke. **Hypertension**, v. 66, n. 1, p. 141-148, 2015.

BENNION, D. M.; JONES, C. H.; DONNANGELO, L. L.; GRAHAM, J. T.; ISENBERG, J. D.; DANG, A. N.; RODRIGUEZ, V.; SINISTERRA, R. D. M.; SOUSA, F. B.; SANTOS R. A. S. SUMNERS, C. Neuroprotection by post-stroke administration of an oral formulation of angiotensin-(1-7) in ischaemic stroke. **Exp Physiol**, v. 103, n. 6, p. 916-923, 2018.

BENNION, D. M.; ROSADO, C. A.; HALTIGAN, R. W. R.; SUMNERS, C.; WATERS, M. F. Serum activity of angiotensin converting enzyme 2 is decreased in patients with acute ischemic stroke. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**. V. 17, n. 3, p. 1-7, 2016.

BERNARDES, D.; BRAMBILLA, R.; BRACCHI-RICARD, V.; KARMALLY, S.; DELLAROLE, A.; CARVALHO-TAVARES, J.; BETHEA, J. R. Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neurochem**, v. 136, suppl. 1, p. 63-73, 2016.

BERNARDES, D.; OLIVEIRA-LIMA, O. C.; SILVA, T. V.; FARACO, C. C.; LEITE, H. R.; JULIANO, M. A.; SANTOS, D. M.; BETHEA, J. R.; BRAMBILLA, R.; ORIAN, J. M.;

ARANTES, R. M.; CARVALHO-TAVARES, J. Differential brain and spinal cord cytokine and BDNF levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise. **J Neuroimmunol**, v. 264, n. 1-2, p. 24-34, 2013.

BETTELLI, E.; DAS, M. P.; HOWARD, E. D.; WEINER, H. L.; SOBEL, R. A.; KUCHROO, V. K. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. **J Immunol**, v. 161, n. 7, p. 3299-3306, 1998.

BIAN, W.; SUN, L.; YANG, L.; LI, J. F.; HU, J.; ZHENG, S.; GUO, R.; FENG, D.; MA, Q.; SHI, X.; XIONG, Y.; YANG, X.; SONG, R.; XU, J.; WANG, S.; HE, J. Stabilization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas through interaction with PSD95. **Biochem J**, v. 453, n. 3, p. 345-356, 2013.

BIHL, J. C.; ZHANG, C.; ZHAO, Y.; XIAO, X.; MA, X.; CHEN, Y.; CHEN, S.; ZHAO, B.; CHEN, Y. Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NF κ B inflammatory pathway. **Vascul Pharmacol**, v. 73, p. 115-123, 2015.

BINYAMIN O.; LARUSH, L.; FRID, K.; KELLER, G.; FRIEDMAN-LEVI, Y.; OVADIA, H.; ABRAMSKY, O.; MAGDASSI, S.; GABIZON, R. Treatment of a multiple sclerosis animal model by a novel nanodrop formulation of a natural antioxidant. **Int J Nanomedicine**, v. 10, n. 7, p. 164-174, 2015.

BIOTTI, D.; CIRON, J. First-line therapy in relapsing remitting multiple sclerosis. **Rev Neurol (Paris)**, v. 174, n. 6, p. 419-428, 2018.

BITTNER, S.; AFZALI, A. M.; WIENDL, H.; MEUTH, S. G. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 86, p. e51275, 2014.

BJELOBABA, I.; BEGOVIC-KUPRESANIN, V.; PEKOVIC, S., LAVRNJA, I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neurosci Res**, v. 96, n. 6, p. 1021-1042, 2018.

BLAD, C.; TANG, C.; OFFERMANN, S. G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 8, p. 603-319, 2012.

BURNESS, C. B.; DEEKS, E. D. Dimethyl Fumarate: A Review of Its Use in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **CNS Drugs**, v. 28, n.4, p. 373-387 2014.

CARVALHO-TAVARES J., *et al.* A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. **Circulation Research: American Heart Association**, v. 87, n.12, p. 1141-1148, 2000.

CHEN, L.; XUE, Y.; ZHENG, J.; LIU, X.; LIU, J.; CHEN, J.; LI, Z.; XI, Z.; TENG, H.; WANG, P.; LIU, L.; LIU, Y. MiR-429 Regulated by Endothelial Monocyte Activating Polypeptide-II (EMAP-II) Influences Blood-Tumor Barrier Permeability by Inhibiting the Expressions of ZO-1, Occludin and Claudin-5. **Front Mol Neurosci**, v. 11, n. 35, p. 1-15, 2018.

CHEN, X. H.; RUAN, C. C.; GE, Q.; MA, Y.; XU, J. Z.; ZHANG, Z. B.; LIN, J. R.; CHEN, D. R.; ZHU, D. L.; GAO, P. J. Deficiency of Complement C3a and C5a Receptors Prevents Angiotensin II-Induced Hypertension via Regulatory T Cells. **Circ Res**, v. 122, n. 7, p. 970-983, 2018.

CHOI, J. K.; DAMBUZA, I. M.; HE, C.; YU, C. R.; UCHE, A. N.; MATTAPALLIL, M. J.; CASPI, R. R.; EGWUAGU, C. E. IL-12p35 Inhibits Neuroinflammation and Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis. **Front Immunol**, v. 8, n. 1258, p. 1-10, 2017.

COMABELLA, M.; KHOURY, S. J. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Clin Immunol**, v. 142, p. 2-8, 2012.

CONSTANTINESCU, C. S.; FAROOQI, N.; O'BRIEN, K.; GRAN, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **Br J Pharmacol**. V. 164, n. 4, p. 1079-1106, 2011.

CRAMER, S. P.; MODVIG, S.; SIMONSEN, H. J.; FREDERIKSEN, J. L.; LARSSON, H. B. W. Permeability of the blood–brain barrier predicts conversion from optic neuritis to multiple sclerosis. **Brain**. v. 138, p. 2571-2583, 2015.

CUNHA, S.; ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBO, J. M. S.; SILVA, A. C. Intranasal lipid nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. **Curr Pharm Des**. V. 23, n. 43, p. 6553-6562, 2017.

DARABI, S.; MOHAMMADI, M. T. Fullerenol nanoparticles decrease ischaemia-induced brain injury and oedema through inhibition of oxidative damage and aquaporin-1 expression in ischaemic stroke. **Brain Inj**, v. 31, n. 8, p. 1142-1150, 2017.

DARGAHI, N.; KATSARA, M.; TSELIOS, T.; ANDROUTSOU, M. E.; COURTEN, M.; MATSOUKAS, J.; APOSTOLOPOULOS, V. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. **Brain Sci**, v. 7, n. 78, p. 1-27, 2017.

DE BRUIN, N. M.; SCHMITZ, K.; SCHIFFMANN, S.; TAFFERNER, N.; SCHMIDT, M.; JORDAN, H.; HÄUßLER, A.; TEGEDER, I.; GEISLINGER, G.; PARNHAM, M. J. Multiple rodent models and behavioral measures reveal unexpected responses to FTY720 and DMF in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Behav Brain Res**. v. 300, p. 160-174, 2016.

DELLAVALLE, B.; MANRESA-ARRAUT, A.; HASSELDAM, H.; STENSBALLE, A.; RUNGBY, J.; LARSEN, A.; HEMPEL, C. Detection of Glycan Shedding in the Blood: New Class of Multiple Sclerosis Biomarkers? **Front Immunol**, v. 9, n. 1254, p. 1-9, 2018.

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

DOLATI, S.; BABALOO, Z.; JADIDI-NIARAGH, F.; AYROMLOU, H.; SADREDDINI, S.; YOUSEFI, M. Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems. **Biomed Pharmacother**, v. 86, p. 343-353, 2017.

DONG, J.; SHANG, Y.; INTHAVON, K.; CHAN, H. K.; TU, J. Numerical Comparison of Nasal Aerosol Administration Systems for Efficient Nose-to-Brain. **Drug Delivery. Pharm Res**, v. 35, n. 1, p. 5, 2017.

DOPKINS, N.; NAGARKATTI, P. S.; NAGARKATTI, M. The role of gut microbiome and associated metabolome in the regulation of neuroinflammation in multiple sclerosis and its implications in attenuating chronic inflammation in other inflammatory and autoimmune disorders. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 178-185, 2018.

DOS SANTOS, A. C.; BARSANTE, M. M.; ARANTES, R. M.; BERNARD, C. C.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO-TAVARES, J. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study. **J Neuroimmunol**, v. 162, p. 122-129, 2005.

DOS SANTOS, A. C.; ROFFÊ, E.; ARANTES, R. M. E.; JULIANO, L.; PESQUERO, J. L.; PESQUERO, J. B.; BADER, M.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO-TAVARES, J. Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 49, p. 1-10, 2008.

FAISSNER, S.; GOLD, R. Efficacy and Safety of the Newer Multiple Sclerosis Drugs Approved Since 2010. **CNS Drugs**, v. 32, n. 3, p. 269-287, 2018.

FERNANDES, L. F.; BRUCH, G. E.; MASSENSINI, A. R.; FRÉZARD, F. Recent Advances in the Therapeutic and Diagnostic Use of Liposomes and Carbon Nanomaterials in Ischemic Stroke. **Front Neurosci**, v. 12, n. 453, p. 1-15, 2018.

FONTES, M.; A. P.; VAZ, G. C.; CARDOSO, T. Z. D.; DE OLIVEIRA, M. F.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; DOS SANTOS, R. A. S.; SHARMA, N. M.; PATEL, K. P.; FRÉZARD, F. GABA-containing liposomes: neuroscience applications and

translational perspectives for targeting neurological diseases. **Nanomedicine**. v. 14, n, 3, p. 781-788, 2018.

FORRESTER, S. J.; BOOZ, G. W.; SIGMUND, C. D.; COFFMAN, T. M.; KAWAI, T.; RIZZO, V.; SCALIA, R.; EGUCHI, S. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 98, n. 3, p. 1627-1738, 2018.

FREUND, M.; WALTHER, T.; VON BOHLEN, U. N. D.; HALBACH, O. Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. **Cell Tissue Res**, v. 348, n. 1, p. 29-35, 2012.

FREY, W. H. Neurologic Agents for Nasal Administration to the Brain. Emeryville, CA: Chiron Corporation; 1991.

GAJOFATTO, A.; TURATTI, M. Investigational immunosuppressants in early stage clinical trials for the treatment of multiple sclerosis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 27, n. 3, p. 273-286, 2018.

GEBRE, A. K.; ALTAYE, B. M.; ATEY, T. M.; TUEM, K. B.; BERHE, D. F. Targeting Renin-Angiotensin System Against Alzheimer's Disease. **Front Pharmacol**, v. 9, n. 440, p. 1-11, 2018.

GHASEMI, N.; RAZAVI, S.; NIKZAD, E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. **Cell Journal**. v. 19, n. 1, p. 1-10, 2017.

GIRONACCI, M. M.; VICARIO, A.; CERESO, G.; SILVA, M. G. The depressor axis of the renin-angiotensin system and brain disorders: a translational approach. **Clin Sci**, v. 132, n. 10, p. 1021-1038, 2018.

GLANZ, B. I.; MUSALLAM, A.; RINTELL, D. J.; CHITNIS, T.; WEINER, H. L.; HEALY, B. C. Treatment satisfaction in multiple sclerosis. **International Journal of MS Care**, v. 16, n. 2, p. 68-75, 2014.

GOLDSTEIN, J.; CARDEN, T. R.; PEREZ, M. J.; TAIRA, C. A.; HÖCHT, C.; GIRONACCI, M. M. Angiotensin-(1-7) protects from brain damage induced by shiga toxin 2-producing enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 311, n. 6, p. R1173-R1185, 2016.

GOMES, J. R.; CABRITO, I.; SOARES, H. R.; COSTELHA, S.; TEIXEIRA, A.; WITTELSBERGER, A.; STORTELEERS, C.; VANLANDSCHOOT, P.; SARAIVA, M. J. Delivery of an anti-transthyretin Nanobody to the brain through intranasal administration reveals transthyretin expression and secretion by motor neurons. **J Neurochem**, v. 145, n. 5, p. 393-408, 2018.

GOUDARZVAND, M.; AFRAEI, S.; YASLIANIFARD, S.; GHIASY, S.; SADRI, G.; KALVANDI, M.; ALINIA, T.; MOHEBB, A.; YAZDANI, R.; AZARIAN, S. K.; MIRSHAFIEY, A.; AZIZI, G. Hydroxycitric acid ameliorates inflammation and oxidative stress in mouse models of multiple sclerosis. **Neural Regen Res**, v. 11, n. 10, p. 1610-1616, 2016.

GUIMARAES, P. S.; OLIVEIRA, M. F.; BRAGA, J. F.; NADU, A. P.; SCHREIHOFER, A.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Increasing angiotensin-(1-7) levels in the brain attenuates metabolic syndrome-related risks in fructose-fed rats. **Hypertension**, v. 63, n. 5, p. 1078-1085, 2014.

GUO, X.; NAMEKATA, K.; KIMURA, A.; HARADA, C.; HARADA, T. The Renin-Angiotensin System Regulates Neurodegeneration in a Mouse Model of Optic Neuritis. **Am J Pathol**, v. 187, n. 12, p. 2876-2885, 2017.

HAFNER, D. A. Multiple sclerosis. **J Clin Invest**, v. 113, p. 788-794, 2004.

HAMMER, A.; STEGBAUER, J.; LINKER, R. A. Macrophages in neuroinflammation: role of the renin-angiotensin-system. **Pflugers Arch**, v. 469, p. 431-444, 2017.

HAMMER, A.; YANG, G.; FRIEDRICH, J.; KOVACS, A.; LEE, D. H.; GRAVE, K.; JÖRG, S.; ALENINA, N.; GROSCH, J.; WINKLER, J.; GOLD, R.; BADER, M.; MANZEL, A.; RUMP, L. C.; MÜLLER, D. N.; LINKER, R. A.; STEGBAUER, J. Role of

the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA**. v, 113, n. 49, p. 14109-14114, 2016.

HAN, R.; XIAO, J.; ZHAI, H.; HAO, J. Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 97, p. 1-14, 2016.

HAY, M.; VANDERAH, T. W.; JAHANI, F. S.; CONSTANTOPOULOS, E.; UPRETY, A. R.; BARNES, C. A.; KONHILAS, J. Cognitive Impairment in Heart Failure: A Protective Role for Angiotensin-(1-7). **Behavioral Neuroscience**, v. 131, n. 1, p. 99-114, 2017.

HEGAZY, M. A.; MAKLAD, H. M.; SAMY, D. M.; ABDELMONSIF, D. A.; EL SABAA, B. M.; ELNOZAHY, F. Y. Cerium oxide nanoparticles could ameliorate behavioral and neurochemical impairments in 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease in rats. **Neurochem**, v. 108, p. 361-371, 2017.

HERNÁNDEZ-PEDRO, N. Y.; ESPINOSA-RAMIREZ, G.; DE LA CRUZ, V. P.; PINEDA, B.; SOTELO, J. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. **Clin Dev Immunol**. v. 2013, p. 1-15, 2013.

HU, K.; CHEN, X.; CHEN, W.; ZHANG, L.; LI, J.; YE, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; LI, C. H.; YIN, L.; GUAN, Y. Q. Neuroprotective effect of gold nanoparticles composites in Parkinson's disease model. **Nanomedicine**, v. 14, n. 4, p. 1123-1139, 2018.

HUBER, S.; GAGLIANI, N.; ESPLUGUES, E. O'CONNOR JR.; HUBER, F. J.; CHAUDHRY, A.; KAMANAKA, M.; KOBAYASHI, Y.; BOOTH, C.J.; RUDENSKY, A. Y.; RONCAROLO, M.G.; BATTAGLIA, M.; FLAVELL, R. A. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10dependent manner. **Immunity** v. 34, p. 554–565, 2011.

ILLUM, L. Nasal drug delivery – recent developments and future prospects. **J Control Release**, v. 161, n. 2, p. 254-263, 2012.

IUSUF, D.; HENNING, R. H.; VAN GILST, W. H.; ROKS, A. J. Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. **Eur J Pharmacol**, v. 585, n. 2-3, p. 303-312, 2008.

JACKSON, L.; ELDAHSHAN, W.; FAGAN, S. C.; ERGUL, A. Within the Brain: The Renin Angiotensin System. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 876, p. 1-23, 2018.

JIANG, T.; GAO, L.; GUO, J.; LU, J.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. **Br J Pharmacol**, v.7, n. 7, 1520-1532, 2012.

JIANG, T.; GAO, L.; LU, J.; ZHANG, Y. D. ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 2, p. 209-217, 2013.

JIANG, T.; YU, J. T.; ZHU, X. C.; ZHANG, Q. Q.; TAN, M. S.; CAO, L.; WANG, H. F.; LU, J.; GAO, Q.; ZHANG, Y. D.; TAN, L. Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 18, p. 4222-4232, 2014.

JOURGHANIAN, P.; GHAFFARI, S.; ARDJMAND, M.; HAGHIGHAT, S.; MOHAMMADNEJAD, M. Sustained release curcumin loaded solid lipid nanoparticles. **Adv Pharm Bull**, v. 6, n. 1, p. 17-21, 2016.

KANAYAMA, M., HE, Y. W. AND SHINOHARA, M. L. The lung is protected from spontaneous inflammation by autophagy in myeloid cells. **J. Immunol**, v. 194, n. 11, p. 5465-5471, 2015.

KANGUSSU, L. M.; GUIMARAES, P. S.; NADU, A. P.; MELO, M. B.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Activation of angiotensin-(1-7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)²⁷ rats. **Neuropharmacology**, v. 97, p. 58-66, 2015.

KARNIK, S. S.; UNAL, H.; KEMP, J. R.; TIRUPULA, K. C.; EGUCHI, S.; VANDERHEYDEN, P. M.; THOMAS, W. G. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 4, p. 754-819, 2015.

KAWAGUCHI, A. T.; YAMANO, M.; HAIDA, M.; OHBA, H.; KAKIUCHI, T.; ANDTSUKADA, H. Effect of oxygen affinity of liposome-encapsulated hemoglobin on cerebral ischemia and reperfusion as detected by positron emission tomography in nonhuman primates. **Artif.Organs**, v. 41, p. 336-345, 2017.

KEHOE, P. G.; WONG, S.; MULHIM, N. A. L.; PALMER, L. E.; MINERS, J. S. Angiotensin-converting enzyme 2 is reduced in Alzheimer's disease in association with increasing amyloid- β and tau pathology. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 50, 2016.

KHAJAH, M. A.; FATEEL, M. M.; ANANTHALAKSHMI, K. V.; LUQMANI, Y. A. Anti-inflammatory action of angiotensin 1-7 in experimental colitis may be mediated through modulation of serum cytokines/chemokines and immune cell functions. **Dev Comp Immunol**, v. 74, p. 200-208, 2017.

KHAN, A. R.; LIU, M.; KHAN, M. W.; ZHAI, G. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. **J Control Release**, v. 28, p. 364-389, 2017.

KHERADMAND, E.; HAJIZADEH MOGHADDAM, A.; ZARE, M. Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease. **Biomed Pharmacother**, v. 97, p. 1096-1101, 2018.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomed Pharmacother**, v. 103, p. 598-613, 2018.

KIM, J. S.; LEE, G. J.; LEE, T. W.; IHM, C. G.; LEE, Y. H.; KIM, Y. G.; MOON, J. Y.; LEE, S. H.; KIM, J. H.; KANG, S. W.; CHAE, S. J.; PARK, H. K.; JEONG, K. H. Observations of the Effects of Angiotensin II Receptor Blocker on Angiotensin II-

Induced Morphological and Mechanical Changes in Renal Tubular Epithelial Cells Using Atomic Force Microscopy. **Biomed Res Int**, v. 2018, p.1-6.

KIM, M. J.; REHMAN, S. U.; AMIN, F. U.; KIM, M. O. Enhanced neuroprotection of anthocyanin-loaded PEG-gold nanoparticles against A β 1-42-induced neuroinflammation and neurodegeneration via the NF-KB /JNK/GSK3 β signaling pathway. **Nanomedicine**, v. 13, n. 8, p. 2533-2544, 2017.

KIM, Y. C.; ZHANG, A. H.; YOON, J.; CULP, W. E.; LEES, J. R.; WUCHERPFENNIG, K. W.; SCOTT, D. W. Engineered MBP-specific human Tregs ameliorate MOG-induced EAE through IL-2-triggered inhibition of effector T cells. **J Autoimmun**, v. 92, p. 77-86, 2018.

KIMURA, K.; HOHJOH, H.; YAMAMURA, T. The Role for Exosomal microRNAs in Disruption of Regulatory T Cell Homeostasis in Multiple Sclerosis. **J Exp Neurosci**, v. 12, p. 1-3, 2018.

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration–rehydration vesicles (DRV): a new method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, p. 979–984, 1984.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.13, n.3, p.159-75. 2013.

KUEHL, C.; THATI, S.; SULLIVAN, B.; SESTAK, J.; THOMPSON, M.; SIAHAAN, T.; BERKLAND, C. Pulmonary Administration of Soluble Antigen Arrays Is Superior to Antigen in Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J Pharm Sci**, v. 106, n. 11, p. 3293-3302, 2017.

KUERTEN, S.; KOSTOVA-BALES, D. A.; FRENZEL, L. P.; TIGNO, J. T.; TARY-LEHMANN, M.; ANGE-LOV, D. N.; LEHMANN, P. V. MP4- and MOG35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. **J Neuroimmunol**, v. 189, n. 1-2, p. 31-40, 2007.

KUMAR, A.; PANDEY, A. N.; JAIN, S. K. Nasal nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. **Drug Deliv**, v. 23, n. 3, p. 681-693, 2016.

KUMAR, P.; SHARMA, G.; GUPTA, V.; KAUR, R.; THAKUR, K.; MALIK, R.; KUMAR, A.; KAUSHAL, N.; RAZA, K. Preclinical Explorative Assessment of Dimethyl Fumarate-Based Biocompatible Nanolipoidal Carriers for the Management of Multiple Sclerosis. **ACS Chem Neurosci**, v. 9, n. 5, p. 1152-1158, 2018.

LA MANTIA, L.; DI PIETRANTONJ, C.; ROVARIS, M.; RIGON, G.; FRAU, S.; BERARDO, F.; GANDINI, A.; LONGOBARDI, A.; WEINSTOCK-GUTTMAN, B.; VAONA, A. Interferon-beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis. **The Cochrane Databases of Systematic Reviews**, v. 7, p.1-70, 2014.

LAFUENTE, J. V.; REQUEJO, C.; CARRASCO, A.; BENGOETXEA, H. Nanoformulation: A Useful Therapeutic Strategy for Improving Neuroprotection and the Neurorestorative Potential in Experimental Models of Parkinson's Disease. **Int Rev Neurobiol**, v. 137, p. 137-199, 2017.

LAI, F.; FADDA, A. M.; SINICO, C. Liposomes for brain delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 10, n. 7, p. 1003-1022, 2013.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 45, n. 1, p. 89-121, 2000.

LEHMANN-HORN, K.; KINZEL, S.; WEBER, M. S. Deciphering the Role of B Cells in Multiple Sclerosis-Towards Specific Targeting of Pathogenic Function. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 2048, p. 1-18, 2017.

LERAY, E.; MOREAU, T.; FROMONT, A.; EDAN, G. Epidemiology of multiple sclerosis. **Revue Neurologique**, v. 171, n. 1, p. 3-13, 2015.

LI, M.; WHEN, Y.; ZHANG, R.; XIE, F.; ZHANG, G.; QUIN, X. Adenoviral vector-induced silencing of RGMa attenuates blood-brain barrier dysfunction in a rat model of MCAO*reperfusion. **Brain Res Bull**, v. 20, n. 142, p. 54-62, 2018.

LIEBNER, S.; DIJKHUIZEN, R. M.; REISS, Y.; PLATE, K. H.; AGALLIU, D.; CONSTANTIN, G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. **Acta Neuropathol**, v. 135, n. 3, p. 311-336, 2018.

LINKER, R. A.; HAGHIKIA, A. Dimethyl fumarate in multiple sclerosis: latest developments, evidence and place in therapy. **Ther Adv Chronic Dis**, v. 7, n. 4, p. 198-207, 2016.

LIU, M.; SHI, P.; SUMNERS, C. Direct anti-inflammatory effects of angiotensin (1-7) on microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 132, n. 1, p. 163-171, 2016.

LUBINA-DĄBROWSKA, N.; STEPIEŃ, A.; SULKOWSKI, G.; DĄBROWSKA-BOUTA, B.; LANGFORT, J.; CHALIMONIUK, M. Effects of IFN- β 1a and IFN- β 1b treatment on the expression of cytokines, inducible NOS (NOS type II), and myelin proteins in animal model of multiple sclerosis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 65, n. 4, p. 325-338, 2017.

MAAROUF, A.; BOUTIÈRE, C.; RICO, A.; AUDOIN, B.; PELLETIER, J. How much progress has there been in the second-line treatment of multiple sclerosis: A 2017 update. **Rev Neurol (Paris)**, v. 174, n. 6, p. 429-440, 2018.

MAGALHAES, G. S.; BARROSO, L. C.; REIS, A. C.; RODRIGUES-MACHADO, M. G.; GREGÓRIO, J. F.; MOTTA-SANTOS, D.; OLIVEIRA, A. C.; PEREZ, D. A.; BARCELOS, L. S.; TEIXEIRA, M. M.; SANTOS, R. A. S.; PINHO, V.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma. **Front Immunol**, v. 9, n. 58, p. 1-10, 2018.

MARIJON, A.; BONNOT, G.; FOURIER, A.; BRINGER, C.; LAVOIGNAT, A.; GAGNIEU, M. C.; BIENVENU, A. L.; PICOT, S. Efficacy of intranasal administration of artesunate in experimental cerebral malaria. **Malar J**, v. 13, n. 501, p. 1-10, 2014.

MÁRQUEZ-MIRANDA, V.; ABRIGO, J.; RIVERA, J. C.; ARAYA-DURÁN, I.; ARAVENA, J.; SIMON, F.; PACHECO, N.; GONZÁLEZ-NILO, F. D.; CABELLO-VERRUGIO, C. The complex of PAMAM-OH dendrimer with Angiotensin (1-7)

prevented the disuse-induced skeletal muscle atrophy in mice. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 1985-1999, 2017.

MÄURER, M.; COMI, G.; FREEDMAN, M. S.; KAPPOS, L.; OLSSON, T. P.; WOLINSKY, J. S.; MILLER, A. E.; POULETTY, C. D.; BOZZI, S.; O'CONNOR, P. W. Multiple sclerosis relapses are associated with increased fatigue and reduced health-related quality of life – A post hoc analysis of the TEMSO and TOWER studies. **Multiple sclerosis and Related Disorders**, v. 7, p. 33-40, 2016.

MCNICHOLAS, N.; HUTCHINSON, M.; MCGUIGAN, C.; CHATAWAY, J. 2017 McDonald diagnostic criteria: A review of the evidence. **Mult Scler Relat Disord**, v. 24, p. 48-54, 2018.

MECCA, A. P.; REGENHARDT, R. W.; O'CONNOR, T. E.; JOSEPH, J. P.; RAIZADA, M. K.; KATOVICH, M. J.; SUMNERS, C. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. **Exp Physiol**, v. 96, n. 10, p. 1084-1096, 2011.

MEREDITH, M. E.; SALAMEH, T.; BANKS, W. A. Intranasal Delivery of Proteins Peptides in the Treatment of neurodegenerative Diseases. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 4, p. 780-787, 2015.

MILJKOVIC, D.; SPASOJEVIC, I. Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 18, p. 2286-2334, 2013.

MILLER, D. H.; WEINSHENKER, B. G.; FILIPPI, M.; BANWELL, B. L.; COHEN, J. A.; FREEDMAN, M. S.; GALETTA, S. L.; HUTCHINSON, M.; JOHNSON, R. T.; KAPPOS, L.; KIRA, J.; LUBLIN, F. D.; MCFARLAND, H. F.; MONTALBAN, X.; PANITCH, H.; RICHERT, J. R.; REINGOLD, S. C.; POLMAN, C. H. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. **Mult Scler**, v. 14, n. 9, p. 1157-1174, 2008.

MILO, R.; MILLER, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmun Rev**, v. 13, n. 4-5, p. 518-524, 2014.

MIYAJIMA, A.; KOSAKA, T.; KIKUCHI, E.; OYA, M. Renin-angiotensin system blockade: Its contribution and controversy. **Int J Urol**, v. 22, n. 8, p. 721-730, 2015.

MOGI, M.; HORIUCH, I. M. Effect of angiotensin II type 2 receptor on stroke, cognitive impairment and neurodegenerative diseases. **Geriatr Gerontol Int**, v. 13, n. 1, p. 13-18, 2013.

MONTENEGRO, L.; CAMPISI, A.; SARPIETRO, M. G.; CARBONE, C.; ACQUAVIVA, R.; RACITI, G.; PUGLISI, G. In vitro evaluation of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the brain. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 37, n. 6, p. 737-746, 2011.

MORALES-ZAVALA, F.; ARRIAGADA, H.; HASSAN, N.; VELASCO, C.; RIVEROS, A.; ÁLVAREZ, A. R.; MINNITI, A. N.; ROJAS-SILVA, X.; MUÑOZ, L. L.; VASQUEZ, R.; RODRIGUEZ, K.; SANCHEZ-NAVARRO, M.; GIRALT, E.; ARAYA, E.; ALDUNATE, R.; KOGAN, M. J. Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of β -amyloid peptide in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. **Nanomedicine**, v. 13, n. 7, p. 2341-2350, 2017.

National Multiple Sclerosis Society. Disponível em: <https://www.nationalmssociety.org/Treating-MS/Medications>. Acessado em: 06 de junho de 2018.

NEMEN, D., LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quim Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NEMOTO, W.; OGATA, Y.; NAKAGAWASAI, O.; YAOITA, F.; TADANO, T.; TAN-NO, K. Angiotensin (1-7) prevents angiotensin II-induced nociceptive behaviour via inhibition of p38 MAPK phosphorylation mediated through spinal Mas receptors in mice. **Eur J Pain**, v. 18, n. 10, p. 1471-1479, 2014.

NIE, W.; YAN, H.; LI, S.; ZHANG, Y.; YU, F.; ZHU, W.; FAN, F.; ZHU, J. Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone

marrow-derived dendritic cells. **Mol Immunol**, v. 46, n. 3, p. 355-361, 2009.

NURO-GYINA, P. K.; RIESER, E. L.; GRANITTO, M. C.; PEI, W.; LIU, Y.; LEE, P. W.; AQEL, S.; ZHANG, J. LOVETT-RACKE, A. E.; RACKE, M.K.; YANG, Y. Regulation of effector function of CNS autoreactive CD4 T cells through inhibitory receptors and IL-7R α . **J Neuroinflammation**, v. 13, n. 302, p. 1-12, 2016.

ODOARDI, F.; SIE, C.; STREYL, K.; ULAGANATHAN, V. K.; SCHLÄGER, C.; LODYGIN, D.; HECKELSMILLER, K.; NIETFELD, W.; ELLWART, J.; KLINKERT, W. E.; LOTTAZ, C.; NOSOV, M.; BRINKMANN, V.; SPANG, R.; LEHRACH, H.; VINGRON, M.; WEKERLE, H.; FLÜGEL-KOCH, C.; FLÜGEL, A.. T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. 675–679, 2012.

OJHA, S.; KUMAR, B. Preparation and Statistical Modeling of Solid Lipid Nanoparticles of Dimethyl Fumarate for Better Management of Multiple Sclerosis. **Adv Pharm Bull**, v. 8, n. 2, p. 225-233, 2018.

OLIVEIRA-LIMA, O. C.; PINTO, M. C. X.; DUCHENE, J.; QADRI, FATIMUNNISA, S.; SOUZA, L. L.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A.S.; CARVALHO-TAVARES, J. Mas receptor deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced cerebral and systemic inflammation in mice. **Immunobiology**, v. 220, p. 1311-1321, 2015.

ONTANEDA, D.; FOX, R. J. Progressive multiple sclerosis. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 3, p. 237-243, 2015.

ORTIZ, G. G.; PACHECO-MOISÉS, F. P.; MACÍAS-ISLAS, M. Á.; FLORES-ALVARADO, L. J.; MIRELES-RAMÍREZ, M. A.; GONZÁLEZ-RENOVATO, E. D.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, V. E.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. L.; ALATORRE-JIMÉNEZ, M. A. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. **Arch Med Res**, v. 45, n. 8, p. 687-97, 2014.

PADDA, R. S.; SHI, Y.; Lo, C. S.; ZHANG, S. L.; CHAN, J. S. D. Angiotensin-(1-7): A Novel Peptide to Treat Hypertension and Nephropathy in Diabetes? **J Diabetes Metab**, v. 6, n. 10, p. 1-12, 2015.

PALLE, P.; MONAGHAN, K. L.; MILNE, S. M.; WAN, E. C. K. Cytokine Signaling in Multiple Sclerosis and Its Therapeutic Applications. **Med Sci (Basel)**, v. 5, n. 4, p. 1-17, 2017.

PALUMBO, S.; PELLEGRINI, S. Experimental In Vivo Models of Multiple Sclerosis: State of the Art. In: Zagon IS, McLaughlin PJ, editors. Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Nov 27. Chapter 11.

PAN, Y.; LU, H. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and susceptibility to Kawasaki disease: a meta-analysis. **Afr Health Sci**, v. 17, n. 4, p. 991-999, 2017.

PAPADOPOULOU, A.; DERFUSS, T.; SPRENGER, T. Daclizumab for the treatment of multiple sclerosis. **Neurodegener Dis Manag**, v. 7, n. 5, p. 279-297, 2017.

PARDO, G.; JONES, D. E. Correction to: The sequence of disease-modifying therapies in relapsing multiple sclerosis: safety and immunologic considerations. **J Neurol**, v. 264, n. 12, p. 2375-2377, 2017.

PARODI, B.; ROSSI, S.; MORANDO, S.; CORDANO, C.; BRAGONI, A.; MOTTA, C.; USAI, C.; WIPKE, B.; SCANNEVIN, R.; MANCARDI, G.; CENTONZE, D.; ROSBO, N.; UCCELLI, A. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. **Acta Neuropathol**, v. 130, n. 2, p. 279-295, 2015.

PARTOAZAR, A.; NASOOHI, S.; REZAYAT, S. M.; GILANI, K.; MEHR, S. E.; AMANI, A.; RAHIMI, N.; DEHPOUR, A. R. Nanoliposome containing cyclosporine A reduced neuroinflammation responses and improved neurological activities in cerebral ischemia/reperfusion in rat. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 31, n. 2, p. 185-193, 2017.

PAWLIK, M. W.; KWIECIEN, S.; PAJDO, R.; PTAK-BELOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, B.; KRZYSIEK-MACZKA, G.; STRZALKA, M.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T. Esophagoprotective activity of angiotensin-(1-7) in experimental model of acute reflux esophagitis. Evidence for the role of nitric oxide, sensory nerves, hypoxia-inducible factor-1alpha and proinflammatory cytokines. **J Physiol Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 809-822, 2014.

PEDRO, N. Y. H.; RAMIREZ, G. E.; CRUZ, V. P.; PINEDA, B.; SOTELO, J. Initial Immunophatogenesis of Multiple Sclerrosis: Innate imune responses. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, p. 1-15, 2013.

PEREIRA A. B. C. N.; LACATIVA, M. C. S.; PEREIRA , F. F. C. C.; ALVARENGA, R. M. P. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Mult Scler Relat Disord**, v. 4, n. 6, p. 572-579, 2015.

PHILLIPS, J. T.; SELMAJ, K.; GOLD, R.; FOX, R. J.; HAVRDOVA, E.; GIOVANNONI, G. ABOURJAILY, H.; PACE, A.; NOVAS, M.; HOTERMANS, C.; VIGLIETTA, V.; MELTZER, L. Clinical significance of gastrointestinal and flushing events in patients with multiple sclerosis treated with delayed-release dimethyl fumarate. **Int J MS Care**, v. 17, n. 5, p. 236-243, 2015.

PLATTEN, M.; *et al.* Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 35, p. 14948-14953, 2009.

PODBIELSKA, M.; O'KEEFFE, J.; HOGAN, E. L. Autoimmunity in multiple sclerosis: role of sphingolipids, invariant NKT cells and other immune elements in control of inflammation and neurodegeneration. **J Neurol Sci**, v. 385, p. 198-214, 2018.

POSSA, M. F.; MINACAPELLI, E.; CANALE, S.; COMI, G.; MARTINELLI, V.; FALAUTANO, M. The first year after diagnosis: psychological impact on people with multiple sclerosis. **Psychology, Health & Medicine**, v. 22, n. 9, p. 1063-1071, 2017.

PRASAD, T.; VERMA, A.; LI, Q. Expression and cellular localization of the Mas

receptor in the adult and developing mouse retina. **Mol Vis**, v. 20, p. 1443-1450, 2014.

PREININGEROVA, J. L.; VACHOVA, M. Daclizumab high-yield process in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. **Ther Adv Neurol Disord**, v. 10, n. 1, p. 67-75, 2017.

RABIE, M. A.; ABD EL FATTAH, M. A.; NASSAR, N. N.; EL-ABHAR, H. S.; ABDALLAH, D. M. Angiotensin 1-7 ameliorates 6-hydroxydopamine lesions in hemiparkinsonian rats through activation of MAS receptor/PI3K/Akt/BDNF pathway and inhibition of angiotensin II type-1 receptor/NF- κ B axis. **Biochem Pharmacol**, v. 151, p. 126-134, 2018.

RATCHFORD, J.N.; BROCK-SIMMONS, R.; AUGSBURGER, A.; STEELE, S.U.; MOHN, K.; RHONE, M.; BO, J.; COSTELLO, K. Multiple sclerosis symptom recrudescence at the end of the natalizumab dosing cycle. **International Journal of MS Care**, v. 16, n. 2, p. 92-98, 2014.

REGENHARDT, R. W.; BENNION, D. M.; SUMNERS, C. Cerebroprotective action of angiotensin peptides in stroke. **Clin Sci (Lond)**, v. 126, n. 3, p. 195-205, 2014.

REGENHARDT, R. W.; DESLAND, F.; MECCA, A. P.; PIOQUINTO, D. J.; AFZAL, A.; MOCCO, J.; SUMNERS, C. Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 154-163, 2013.

REGENHARDT, R. W.; MECCA, A. P.; DESLAND, F.; RITUCCI-CHINNI, P. F.; LUDIN J. A.; GREENSTEIN, D.; BANUELOS, C.; BIZON, J. L.; REINHARD, M. K.; SUMNERS, C. Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol**, v. 99, n. 2, p. 442-453, 2014.

ROBINSON, A. P.; HARP, C. T.; NORONHA, A.; MILLER, S. D. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. **Handb Clin Neurol**, v. 122, p. 173-189, 2014.

ROMMER, P. S.; ZETTL, U. K. Managing the side effects of multiple sclerosis therapy: pharmacotherapy options for patients. **Expert Opin Pharmacother**, v. 19, n. 5, p. 483-498, 2018.

SAAVEDRA, J. M. Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. **Cell Mol Neurobiol**, v. 36, n. 2, p. 259-279, 2016.

SAMBUCCI, M.; GARGANO, F.; DE ROSA, V.; DE BARDI, M.; PICOZZA, M.; PLACIDO, R.; RUGGIERI, S.; CAPONE, A.; GASPERINI, C.; MATARESE, G.; BATTISTINI, L.; BORSELLINO, G. FoxP3 isoforms and PD-1 expression by T regulatory cells in multiple sclerosis. **Sci Rep**, v. 8, n. 3674, p.1-9, 2018.

SAMUS, M.; SEELIGE, R.; SCHÄFER, K.; SOROKIN, L.; VESTWEBER, D. CD99L2 deficiency inhibits leukocyte entry into the central nervous system and ameliorates neuroinflammation. **J Leukoc Biol**, p. 1-11, 2018.

SAND, I. K. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 3, p. 193-205, 2015.

SARIA, A.; LUNDBERG, J. M. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. **J Neurosci Methods**, v. 8, n. 1, p. 41-49 1983.

SCOLDING, N. J.; PASQUINI, M.; REINGOLD, S. C.; COHEN, J. A.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON CELL-BASED THERAPIES FOR MULTIPLE SCLEROSIS; INTERNATIONAL CONFERENCE ON CELL-BASED THERAPIES FOR MULTIPLE SCLEROSIS; INTERNATIONAL CONFERENCE ON CELL-BASED THERAPIES FOR MULTIPLE SCLEROSIS. Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis. **Brain**, v. 140, n. 11, p. 2776-2796, 2017.

SHENOY, V.; KWON, K. C.; RATHINASABAPATHY, A.; LIN, S.; JIN, G.; SONG, C.; SHIL, P.; NAIR, A.; QI, Y.; LI, Q.; FRANCIS, J.; KATOVICH, M. J.; DANIELL, H.; RAIZADA, M. K. Oral delivery of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-

(1-7) bioencapsulated in plant cells attenuates pulmonary hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 6, p. 1248-1259, 2014.

SHOBO, A.; PAMREDDY, A.; KRUGER, H. G.; MAKATINI, M. M.; NAICKER, T.; GOVENDER, T.; BAIJNATH, S. Enhanced brain penetration of pretomanid by intranasal administration of an oil-in-water nanoemulsion. **Nanomedicine (Lond)**, v. 13, n. 9, p. 997-1008, 2018.

SILVA-BARCELLOS, N. M.; CALIGIORNE, S.; DOS SANTOS, R. A.; FRÉZARD, F. Site-specific microinjection of liposomes into the brain for local infusion of a short-lived peptide. **J Control Release**, v. 95, n. 2, p. 301-307, 2004.

SILVA-BARCELLOS, N. M.; FRÉZARD, F.; CALIGIORNE, S.; SANTOS, R. A. Long-lasting cardiovascular effects of liposome-entrapped angiotensin-(1-7) at the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension**, v. 38, n. 6, p. 1266-1271, 2001.

SIMÕES E SILVA, A. C.; SILVEIRA, K. D.; FERREIRA, A. J, TEIXEIRA, M. M. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 3, p. 477-492, 2013.

SINGH, I.; NATH, N.; SAXENA, N.; SINGH, A. K.; WON, J. S. Regulation of IL-10 and IL-17 mediated experimental autoimmune encephalomyelitis by S-nitrosoglutathione **Immunobiology**, v. 223, n. 10, p. 549-554, 2018.

SMORODCHENKO, A.; WUERFEL, J.; POHL, E. E.; VOGT, J.; TYSIAK, E.; GLUMM, R.; HENDRIX, S.; NITSCH, R.; ZIPP, F.; INFANTE-DUARTE, C. CNS-irrelevant T-cells enter the brain, cause blood–brain barrier disruption but no glial pathology. **Eur J Neurosci**, v. 26, p. 1387-1398, 2007.

SORENSEN, P. S. Safety concerns and risk management of multiple sclerosis therapies. **Acta Neurol Scand**, v. 136, n. 3, p. 168-186, 2016.

SPARKS, M. A.; CROWLEY, S. D.; GURLEY, S. B.; MIROTSOU, M.; COFFMAN, T. M. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. **Compr Physiol**, v. 4, n.

3, p. 1201-1228, 2014.

STIMMER, L.; FOVET, C. M.; SERGUERA, C. Experimental Models of Autoimmune Demyelinating Diseases in Nonhuman Primates. **Vet Pathol**, v. 55, n. 1, p. 27-41, 2018.

STOJIĆ-VUKANIĆ, Z.; KOTUR-STEVLJEVIĆ, J.; NACKA-ALEKSIĆ, M.; KOSEC, D.; VUJNOVIĆ, I.; PILIPOVIĆ, I.; DIMITRIJEVIĆ, M.; LEPOSAVIĆ, G. Sex Bias in Pathogenesis of Autoimmune Neuroinflammation: Relevance for Dimethyl Fumarate Immunomodulatory/Anti-oxidant Action. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 5, p. 3755-3774, 2018.

SUNG, C., CHIU, C. Y.; LEE, E. J.; BEZYAK, J.; CHAN, F.; MULLER, V. Exercise, Diet, and Stress Management as Mediators Between Functional Disability and Health-Related Quality of Life in Multiple Sclerosis. **Rehabilitation Counseling Bulletin**, v. 56, n. 2, p.85 –95, 2013.

SWEENEY, M. D.; SAGARE, A. P.; ZLOKOVIC, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurol**, v. 14, n. 3, p. 133-150, 2018.

TABANSKY, I.; MESSINA, M. D.; BANGERANYE, C.; GOLDSTEIN, J.; BLITZ-SHABBIR, K. M.; MACHADO, S.; JEGANATHAN, V.; WRIGHT, P.; NAJJAR, S.; CAO, Y.; SANDS, W.; KESKIN, D. B.; STERN, J. N. Advancing drug delivery systems for the treatment of multiple sclerosis. **Immunol Res**, v. 63, n. 1-3, p. 58-69, 2015.

TAPEINOS, C.; BATTAGLINI, M.; CIOFANI, G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. **J Control Release**, v. 264, p. 306-332, 2017.

THATI, S.; KUEHL, C.; HARTWELL, B.; SESTAK, J.; SIAHAAN, T.; FORREST, L.; BERKLAND, C. Routes of Administration and Dose Optimization of Soluble Antigen Arrays in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J Pharm Sci**, v. 104, n. 2, p. 714-721, 2015.

TILLERY EE, CLEMENTS JN, HOWARD Z. What's new in multiple sclerosis? **Ment Health Clin**, v. 7, n. 5, p. 213-220, 2018.

TOPPHOFT, U.; DOYER, M.; PEKAREK, K.; SPENCER, C.; SHETTY, A.; SAGAN, S.; CREE, B.; SOBEL, R.; WIPKE, B. STEINMAN, L.; SCANNEVIN, R.; ZAMVIL, S. Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. **Pnas**, v. 113, n. 17, p. 4777-4782, 2016.

TORKILDSEN, Ø.; MYHR, K. M.; BØ, L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. **European Journal of Neurology**, v. 23, suppl. 1, p. 18-27, 2016.

TSOU, Y. H.; ZHANG, X. Q.; ZHU, H.; SYED, S.; XU, X. Drug Delivery to the Brain across the Blood-Brain Barrier Using Nanomaterials. **Small**, v. 13, n. 43, p. 1-17, 2017.

VAAJANEN, A.; KALESNYKAS, G.; VAPAATALO, H.; UUSITALO, H. The expression of Mas-receptor of the renin-angiotensin system in the human eye. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 253, n. 7, p. 1053-1059, 2015.

VAZ-SILVA, J.; TAVARES, R. L.; FERREIRA, M. C.; HONORATO-SAMPAIO, K.; CAVALLO, I. K.; SANTOS, R. A.; DOS REIS, A. M.; REIS, F. M. Tissue specific localization of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in the uterus of ovariectomized rats. **J Mol Histol**, v. 43, n. 5, p. 597-602, 2012.

VYAS, S. P.; KHAR, R. K. Targetted and controlled drug delivery, Novel carrier systems. Delhi: CBS publishers and distributors; 2007.

WANG, J.; ZHANG, Y.; XIA, J.; CAI, T.; DU, J.; CHEN, J.; LI, P.; SHEN, Y.; ZHANG, A.; FU, B.; GAO, X.; MIAO, F.; ZHANG, J.; TENG, G. Neuronal PirB Upregulated in Cerebral Ischemia Acts as an Attractive Theranostic Target for Ischemic Stroke. **J Am Heart Assoc**, v. 7, n. 3, p. 1-13, 2018.

WU, J.; ZHAO, D.; WU, S.; WANG, D. Ang-(1-7) exerts protective role in blood-brain barrier damage by the balance of TIMP-1/MMP-9. **EUR J Pharmacol**, v. 748, p. 30-36, 2015.

XU, Z.; ZHANG, F.; SUN, F.; GU, K.; DONG, S.; HE, D. Dimethyl fumarate for multiple sclerosis. **Cochrane Database Syst Ver**, v. 22, n. 4, 2015.

YADAV, S. K.; MINDUR, J. E.; ITO, K.; DHIB-JALBUT, S. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 3, p. 206-209, 2015.

YAN, X.; XU, L.; BI, C.; DUAN, D.; CHU, L.; YU, X.; WU, Z.; WANG, A.; SUN, K. Lactoferrin-modified rotigotine nanoparticles for enhanced nose-to-brain delivery: LESA-MS/MS-based drug biodistribution, pharmacodynamics, and neuroprotective effects. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 273-281, 2018.

YANYING, Z.; BINGJIE, G.; XIAOHUI, J.; XINSHENG, D.; CHUNJIE, S.; FEICHI, W. Sinomenine, an antirheumatic alkaloid, ameliorates clinical signs of disease in the Lewis rat model of acute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Biol. Pharm. Bull**, v. 30, n. 8, p. 1438-1444, 2007.

ZAMBELLI, V.; BELLANI, G.; BORSA, R.; POZZI, F.; GRASSI, A.; SCANZIANI, M.; CASTIGLIONI, V.; MASSON, S.; DECIO, A.; LAFFEY, J. G.; LATINI, R.; PESENTI, A. Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. **Intensive Care Med Exp**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2015.

ZHAO, P. Y.; WANG, Y. Q.; LIU, X. H.; ZHU, Y. J.; ZHAO, H.; ZHANG, Q. X.; QI, F.; LI, J. L.; ZHANG, N.; FAN, Y. P.; LI, K. N.; ZHAO, Y. Y.; LEI, J. F.; WANG, L. Bu Shen Yi Sui capsule promotes remyelination correlating with Sema3A/ NRP-1, LIF/LIFR and Nkx6.2 in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 36-48, 2018.