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

Thiago Vitarelli da Silva

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE OS EVENTOS IMUNOLÓGICOS E DEGENERATIVOS INDUZIDOS PELA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE) EM CAMUNDONGOS

Belo Horizonte - MG
2013

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

Thiago Vitarelli da Silva

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE OS EVENTOS IMUNOLÓGICOS E DEGENERATIVOS INDUZIDOS PELA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE) EM CAMUNDONGOS

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.

Orientadora: Profª. Drª. Juliana Carvalho Tavares.
Co-Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

Belo Horizonte - MG
2013

Agradecimentos

Agradecer às pessoas especiais não é uma tarefa fácil, pois muitas vezes as palavras não conseguem expressar o tamanho da minha gratidão.

Agradeço aos meus pais, Worley e José Carlos, por sempre apoiarem minhas escolhas e por me oferecerem o amor incondicional e o suporte para permitir que o percurso fosse feito da forma mais tranqüila possível.

Agradeço ao amor da minha vida, Marina, por tornar mais suave e feliz esse período, que por muitas vezes não foi fácil. Ouvindo meus desabafos e acalentando as minhas aflições e frustrações.

Agradeço a querida orientadora e professora Juliana pela contribuição na minha jornada acadêmica e pessoal. Obrigado pela confiança, paciência, compreensão e carinho.

Agradeço ao Prof. Fabrício por apoiar e incentivar a nossa ideia.

Agradeço ao Prof. Igor e ao Prof. Alfredo pelo suporte ao trabalho e que gentilmente cederam a infraestrutura do seu laboratório para que eu pudesse conduzir parte dos experimentos.

Agradeço à Prof. Rosa e os alunos do seu laboratório pelas constantes colaborações e por me acolherem carinhosamente em seu grupo de pesquisa

Agradeço, em especial, aos meus amigos Danielle, Onésia, Natália, Camila e Marcelo que me acolheram e participaram no desenvolvimento deste estudo, estando sempre à disposição para ajudar e compartilhar ideias.

Agradeço ao Lucas e Estefânia pela disponibilidade em me ensinar e acompanhar ativamente a execução de alguns dos experimentos realizados.

Agradeço aos demais Professores e colegas do NNC pelas oportunidades de integrar o grupo e pela disponibilidade.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, ICB/UFMG, pela chance de realizar esta dissertação.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

Além de todos aqueles que participaram e contribuíram nesta fase da minha vida.

Muito obrigado!

Resumo

A esclerose múltipla é a doença neurologicamente progressiva e incapacitante mais comum entre adultos jovens. A desordem se caracteriza pela ocorrência de desmielinização, inflamação crônica, perda axonal e de oligodendrócitos. A compreensão dos mecanismos imuno-patológicos e possíveis tratamentos é um grande desafio. Para elucidar algumas destas questões o uso de modelos animais, que reproduzem as alterações da doença, representa uma ferramenta útil. Dentre os modelos cita-se a encefalomielite autoimune experimental (EAE) induzida pela imunização com neuroantígenos. O canabidiol (CBD) é o principal componente da *Cannabis sativa*, destituído de efeitos psicoativos. As suas propriedades neuroprotetoras, anti-inflamatórias e antioxidantes já foram documentadas em estudos de diversas desordens. A partir desse cenário, o objetivo da investigação foi avaliar os efeitos do tratamento crônico e profilático com CBD sobre os eventos imunológicos e degenerativos da EAE.

Para tanto, os camundongos C57Bl/6, fêmeas (10-12 semanas, 17-20 gramas), foram divididos em quatro grupos. Os dois primeiros foram submetidos ao EAE, sendo um deles tratado ao longo dos 14 dias de avaliação da doença, com uma dose diária de 5mg/kg da droga por via intra-peritoneal (i.p), e o outro com correspondentes injeções do veículo (Tween 5%). Os demais animais constituíram os controles (sem EAE) que foram divididos, de modo similar, nos grupos CBD e veículo. O modelo foi induzido por injeção subcutânea de uma emulsão contendo 100µg MOG_{35-55} em PBS 1X e solução de 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA em Adjuvante Completo de Freud, além da administração de pertussis toxina (i.p), 300 ng/200µl/animal, em dois momentos diferentes.

Os animais foram monitorados diariamente quanto ao peso corporal e às manifestações clínicas, através de uma escala de escore e periodicamente por teste motor *(Rotarod*) e sensorial (*Tail Flick*). Sendo que o esquema terapêutico aplicado não foi eficaz em reverter a progressão e a gravidade clínica do modelo. No 14º dia pós indução houve a visualização, no cérebro e medula, dos eventos de rolamento e adesão leucocitária através da técnica de microscopia intravital e da integridade da barreira hematoencefálica, pela mensuração do extravasamento do corante azul de Evans. Avaliou-se também, apenas na medula, a expressão por RT-PCR das moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1) e o infiltrado inflamatório. Em relação a estes parâmetros, o fitocanabinóide atenuou a inflamação central observada no modelo. A determinação indireta nos níveis séricos de óxido nítrico (NO), pela reação de Griess, indicou que o tratamento aumentou a biodisponibilidade desse mediador no EAE, que possivelmente pode ter contribuído para parte dos efeitos citados.

A avaliação *in vitro*, pelo ensaio de redução do MTT, reafirmou a capacidade do CBD de inibir a proliferação das células esplênicas em resposta ao MOG_{35-55} por um mecanismo independente de proteína G. Entretanto, a atividade imunossupressora da droga não foi observada *in vivo*, uma vez que o tratamento não reverteu o aumento da contagem global de leucócitos na circulação periférica percebida nos animais EAE.

Considerando os eventos degenerativos característicos do modelo, desmielinização e dano axonal avaliados respectivamente, através da coloração por LFB e pela expressão do neurofilamento-H, a terapia não foi capaz de reverter o decréscimo desses parâmetros.

Em síntese, esse trabalho sugere que o CBD atenuou o processo inflamatório na EAE, interferindo nos vários eventos relacionados à migração leucocitária para o SNC. Entretanto, o canabinoide não alterou os aspectos degenerativos o que refletiu, em parte, na sua ineficácia sobre a clínica do animal.

Abstract

Multiple sclerosis is a progressive and disabling disease neurologically more common among young adults. The disorder is characterized by the occurrence of demyelination, chronic inflammation, axonal and oligodendrocytes loss. Understanding the immuno-pathological mechanisms and possible treatments is a major challenge. To elucidate some of these issues, the use of animal models, that reproduce the disease changes, represent a useful tool. Among the models available, highlights the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced by immunization with neuropeptides. The cannabidiol (CBD) is the main component of Cannabis sativa devoid of psychoactive effects. Its neuroprotective, anti-inflammatory and antioxidants properties have been documented in studies of various disorders. From this scenario, the goal of this investigation was to evaluate the effects of chronic and prophylactic treatment with CBD on immune and degenerative events of EAE.

To reach this aim, C57BL/ 6 female mice (10-12 weeks, 17-20 g) were divided into four groups. Two groups were subjected to EAE model induction, one being treated daily with CBD (5 mg/kg, i.p.) from day 0 to 14 post induction and the second was treated with vehicle (5% Tween). Control groups were divided similarly into vehicle and CBD. The EAE was induced by subcutaneous injection of an emulsion containing 100µg MOG 35-55 plus 4mg/ml of Mycobacterium tuberculosis H37Ra in Freud's Complete Adjuvant. Pertussis toxin (300 ng/animal, i-p.) was injected on the day of immunization and 48 h later.

The animals were monitored daily for body weight and clinical manifestations, across a range of scores, and periodically for motor (*Rotarod*) and sensory (Tail Flick) tests. The therapy used was not effective in reversing the progression and severity of the clinical model. On day 14 post induction, there was visualization of leukocyte adhesion and rolling by intravital microscopy technique, and integrity of the blood brain barrier by measuring of Evans blue dye extravasation in the brain and spinal cord. The expression of adhesion molecules (VCAM-1, ICMA-1) was also evaluated, only in the spinal cord, by RT-PCR and the inflammatory cell infiltration. In relation to these parameters, the drug attenuates central inflammation observed in the model. The indirect determination in serum nitric oxide (NO) by Griess reaction, indicated that treatment increased the bioavailability of this mediator in EAE, which possibly may have contributed to some of the effects mentioned.

The in vitro evaluation, by the MTT reduction assay, confirmed the ability of CBD to inhibit proliferation of splenic cells in response to MOG35-55 by a mechanism independent of G protein. However, the immunosuppressive activity of the drug was not observed in vivo, since the treatment did not reverse the increased total count of the leukocytes in the peripheral circulation seen in EAE animals.

The therapy, though, was not able to reverse the decline of characteristic degenerative events of the model, demyelination and axonal damage, evaluated respectively by staining for LFB and neurofilament-H expression.

In summary, this study suggests that CBD attenuated the inflammatory process in EAE by interfering in various events related to leukocyte migration into the CNS. Nevertheless, the cannabinoid did not alter the degenerative process which reflects, in part, its clinical inefficacy on the animal model.

Lista de Abreviaturas

µm – micrômetro
µg – micrograma
µl - microlitro
2-AG- 2- aracdonoil-glicerol
2-AGE- 2- aracdonoil-glicerol-eter
5-HT$_{1A}$- receptor de serotonina
AEA- aracdonoil-etanolamida
AMPc- adenosina monofosfato cíclico
AMT- transportadores de membrana de anadamida
ANOVA - Análise de variância
BHE – Barreira hematoencefálica
CB- canabinóides
CBD- canabidiol
CD- grupamento de diferenciação (*cluster of differentation*)
CEBIO- Centro de Bioterismo
CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFA- Complexo adjuvante de Freud
cm- centímetro
CSF – Fluido cerebroespinhal
d.p.i- dias pós indução
DMEM- *Dulbeccos´s Modified Medium*
DNA- ácido desoxiribonucleico
cDNA- DNA complementar
EAE - Encefalomielite autoimune experimental
EM- Esclerose múltipla
FAAH: amida hidrolase de ácidos graxo
g - grama
h - horas
H&E – Hematoxilina-eosina
i.p. - Injeção intraperitonial
i.v. - Injeção intravenosa
ICAM - Molécula de adesão intercelular (*Intercellular adhesion molecule*)
IFN-γ - Interferon gama
Ig- imunoglobulina
IL - Interleucina
iNOS - oxido nítrico sintase induzível
JAMs- moléculas de adesão juncional
LFB - *Luxol fast blue*
LPS - lipopolissacarídeo
M - Molar
MAGL - monoacilglicerol lipase
mg - miligrama
mg/Kg - miligrama por Kilograma
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
min- minuto
mL– mililitro
MOG- glicoproteína da mielina de oligodendrócito

MPB- proteína básica da mielina
MTT- 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2*H*-brometo de tetrazolium
NADA- N-aracdonoil-dopamina
Nf- neurofilamento
NF- κB: fator nuclear κB
ng- nanograma
nm- nanômetro
NNC- Núcleo de neurociências
NO - óxido nítrico
NOs- óxido nítrico sintase
ºC - graus celsius
OPCs- células progenitoras de oligodendrócitos
p/v- peso por volume
PAG- substância cinzenta periaquedutal
PBS - salina tampão fosfato
PCAM- *platelet cell adhesion molecule*
pg- picograma
pH – potencial hidrigeniônico
PI3K- fosfatidilinositol 3-quinase
PLP- proteína proteolipídica
PPAR-γ -receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomos
PSGL-1- glicoproteína ligante da P-selectina
PTX- *Pertussis* toxina
RNA- ácido ribonucléico
rpm - rotações por minuto
RT-PCR- reação em cadeia da polimerase em tempo real
ROS- espécie reativa de oxigênio
s- segundos
s.c. – subcutâneo
SNC – Sistema nervoso central
SUS- Sistema único de saúde
TCR- receptores de células T
Th- linfócito T *helper*
THC- Δ9- tetrahidrocanabinol
TMEV- *Theiler's murine encephalomyelitis vírus*
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
TPVR-1- receptor vanilóide tipo 1
Treg- linfócito T regulador
U/µL- unidades por microlitro
UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais
v/v- volume por volume
VCAM- Molécula de adesão celular vascular (*vascular cell adhesion molecule*)
ZO-1-zona ocludina -1

Referências

ACADEMIA brasileira de neurologia. Departamento Científico de Neuroimunologia. Diretrizes para o tratamento da esclerose múltipla com drogas imunomoduladoras. **Arquivo Neuro-Psiquiatria**, v.63, n.3b, p.892-895, set., 2005.

ABBOTT, N. J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n.1, p. 41-53, jan.,2006

AICHER, S. A. *et al*. Hyperalgesia in an animal model of multiple sclerosis. **Pain,** v. 110 , p. 560–570, mar., 2004.

AL-OMAISHI, J.; BASHIR, R.; GENDELMAN, E. The cellular immunology of multiple sclerosis**. Journal of leukocyte biology**, v. 66, n.4, p.444-452, abr., 1999.

ALVAREZ, J. I.; CAYROL, R.; PRAT, A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease,** v.1812, n. 2, p.252–264, fev., 2011.

ARÉVALO-MARTÍN, Á. *et al*. CB2 cannabinoid receptors as an emerging target for demyelinating diseases: from neuroimmune interactions to cell replacement strategies. **British Journal of Pharmacology**, v.153, n.2, p. 216–225, jan., 2008.

AYERS, M. M. et al. Early glial response in murine models of multiple sclerosis. **Neurochemistry international**, v.45, n. 2-3, p.409-419, ago., 2004.

BAKER, D.; JACKSON, S. J.; PRYCE, G. Cannabinoid control of neuroinflammation related to multiple sclerosis. **British Journal of Pharmacology** , v.152, p.649–654, 2007.

BAKER, D.; JACKSON S. J. Models of multiple sclerosis. **ACNR**, v.6, n.6, p.10-12, 2007.

BATOULIS, H.; ADDICKS, K.; KUERTEN, S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/Th1 paradigm. **Annals of anatomy**, v.192, n.4, p.179-193, ago., 2010.

BENNETT, J. *et al*. Blood–brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. **Journal of Neuroimmunology**, v.229, n. 1-2, p.180–191, dez., 2010.

BENNETT, J. L.; STÜVE O. Update on inflammation, neurodegeneration, and immunoregulation in multiple sclerosis: Therapeutic implications. **Clinical Neuropharmacology**, v. 32, n. 3, p.121-132, maio/jun., 2009.

BERARD, J. L. *et al*. Characterization of relapsing-remitting and choric forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL6/6 mice. **Glia**, v.58, n.4, p. 434-445, mar., 2010.

BERTOLLO, C. M. *et al*. Effect of radiation treatment on newly established human breast cancer cell lines MACL-1 and MGSO-3. **Tumor Biology,** v.31, n.3, p.189-97, 2010.

BISOGNO, T. *et al*. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845 -852, out., 2001.

BOOZ, G. W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. **Free Radical Biology e Medicine**, v.51, n.5, p.1054–1061, set., 2011.

BRAMBILLA, R. *et al*. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. **Brain,** v.134, n.9, p. 2736–2754, 2011.

BREITHAUPT, C. *et al*. Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein. **PNAS**, v. 100, n. 16, p. 9446-9451, ago., 2003.

BUDDEBERG, B. S. *et al*. Behavioral testing strategies in a localized animal model of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.153, n.1-2, p.158-170, ago., 2004.

CARDOSO, E. *et al*. Clinical and epidemiological profile of multiple sclerosis in a reference center in the state of Bahia, Brazil. **Arquivo de neuropsiquiatria**, v.64, n.3-b, p727-730, set., 2006.

CARRIER, E. J.; AUCHAMPACH,J. A.; HILLARD,C. J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. **PNAS**, v.103, n. 20, p. 7895-2900, maio, 2006.

CARVALHO, M. H. C. *et al*. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira Hipertensão,** v.8, n.1, p.76-88, jan.-mar., 2001.

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

CHEN, Y.; BUCK, J. Cannabinoids Protect Cells from Oxidative Cell Death: A Receptor -Independent Mechanism.**The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.293, n.3, p.807-812, 2000.

CORREA, C. R.; BERTOLLO, C. M.; GOES, A. M. Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer**. Oncology Research**, v.10, n.17, p. 473-82, 2009.

CORREA, F. *et al*. A role for CB2 receptors in anandamide signalling pathways involved in the regulation of IL-12 and IL-23 in microglial cells. **Biochemical Pharmacology**, v.77, n.1, p. 86 -100, jan. 2009.

COSTA, B. *et al*. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology** , v.556, n. 1-3, p.75–83, fev., 2007.

COYLE, P. K. The neuroimmunology of multiple sclerosis. **Advances in neroimmunology**, v.6, n.2, p.143-154, 1996.

CRAWLEY, J. N. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. **Brain Research**, v.835, n.1, p.18–26, jul. 1999.

CROXFORD, A. L.; KURSCHUS, F.C; WAISMAN, A. Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. **Biochimica et biophysica acta: molecular basis of disease**, v.1812, n.2, p. 177-1783, fev., 2011.

CROXFORD, J. L. *et al*. Cannabinoid-mediated neuroprotection, not immunosuppression, may be more relevant to multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 193, n. 1-2, p.120–129, jan., 2008.

CROXFORD, J. L.; MILLER, S. D. Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R(+)WIN55,212. The **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n.8, p.1231-1240, abr., 2003.

CUDRICI, M. D. C. *et al.* Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. **Journal of rehabilitation research and development**, v. 43, n. 1, p. 123-132, jan./fev., 2006.

D´AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determination loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 72, n. 1, p.74-79, maio, 1941.

DENIC, A. *et al*. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. **Pathophysiology**, v. 18, n. 1, p. 21-29, fev., 2011

EDWARDS, S. G.M. Infratentorial atrophy on magnetic resonance imaging and disability in multiple sclerosis. **Brain,** v.122, n.2, p. 291-301, fev., 1999.

ENGELHARDT, B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood–brain barrier. **Journal of Neural Transmission**, v.113, n.4, p. 477–485, abr., 2006.

EPOSITO, G. *et al*. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in _-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-_B involvement. **Neuroscience Letters**, v. 399, n.1-2, p. 91–95, maio, 2006.

FABIS, M. J. *et al*. Loss of blood–brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models. **PNAS**, v. 104, n. 13, p. 5656-5661, mar., 2007.

FAZIO, F. *et al*. Switch in the expression of mGlu1 and mGlu5 metabotropic glutamate receptors in the cerebellum of mice developing experimental autoimmune encephalomyelitis and in autoptic cerebellar samples from patients with multiple sclerosis. **Neuropharmacology**, v.55, n. 4, p.491-499, set., 2008.

FONSECA, F. R. *et al*. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. **Alcohol & Alcoholism**, v. 40, n. 1, p. 2–14, nov. 2005.

GOLD, R.; LININGTON, C.; LASSMAN, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. **Brain,** v.129, p.1953-1971, abr., 2006.

HAMPSON, A. J. *et al*. Cannabidiol and (-) Δ^9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 8268–8273, jul., 1998.

HASSELDAM, H.; JOHANSEN, F. F. Neuroprotection without Immunomodulation IsNot Sufficient to Reduce First Relapse Severity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Neuroimmunomodulation**, v.17, n.4, p. 252– 264, mar., 2010.

HERZ, J.; ZIPP, F.; SIFFRIN, V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. **Experimental Neurology**, v.225, n.1, p.9–17, set., 2010.

INSIGHT equipamentos científicos. Disponível em: insightltda.com.br.Acesso em: 28 nov. 2011.

IRNIDAYANTI, Y.; DARMANTO, W.; ABADI, A. Expression of gen extracellular matrix and cell adhesion molecule of brain embrio mice at GD-10 by real time RT-PCR. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.58, p.705-708, 2011.

IUVONE, T. *et al*. Cannabidiol: A Promising Drug for Neurodegenerative Disorders? **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v.15, n.1, p. 65–75, 2009.

JONES, J. L.; COLES , A. J. New treatment strategies in multiple sclerosis. **Experimental Neurology**, v.225, n.1, p.34-39 ,set., 2010.

JONES, M.V. *et al.* Behavioral and pathological outcomes in MOG 35–55 experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology** , v. 99, n.1-2, p. 83–93, ago., 2008.

KARGARI, M. *et al*. Relationship between the clinical scoring and demyelination in central nervous system with total antioxidant capacity of plasma during experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice. **Neuroscience Letters,** v.412, n.1, p. 24–28, jan., 2007.

KAWASAKI ,Y. *et al*. Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1β, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor-α in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. **The Journal of Neuroscience**, v.28, n.20, p. 5189 –5194, maio, 2008.

KERFOOT, S. M.; KUBES, P. Overlapping roles of P-Selectin and α4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v.169, n.2, p.1000-1006, 2002.

KERFOOT, S. M. *et al*. Reevaluation of P-Selectin and α4 integrin as targets for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis**. The Journal of Immunology**, v. 176, n. 10, p. 6225-6234, maio ,2006.

KILLESTEIN, J. *et al*. Immunomodulatory effects of orally administered cannabinoids in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 137, n. 1-2, p. 140–143, abr., 2003.

KOJDA, G., HARRISON, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 43, n.3, p. 562–571, ago., 1999.

KORNEK, B.; LASSMANN, H. Neuropathology of multiple sclerosis: new concepts. **Brain research bulletin**, v.61, n.3, p.321-326, ago. 2003.

KOZELA, E. *et al*. Cannabidiol inhibits pathogenic T-cells, decreases spinal microglial activation and ameliotates multiple sclerosis- like disease in C57BL/6 mice. **British journal of pharmacology**, 2011. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011 .01379.x.

KRISHNAMOORTHY, G.; WEKERLE, H. Autoimmune disease: multiple sclerosis. **European journal of immunology**, v.39, n.1, p.1991-2058, jan., 2009.

KUBAJEWSKA, I.; CONSTANTINESCU, C. S. Cannabinoids and experimental models of multiple sclerosis**. Immunobiology**, v.215, n.8, p. 647-657, ago., 2010.

KUBES, P,; SUZUKI, M.; GRANGER, D. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci,** v.88, n.46, p.51-54, 1991.

KUBES, P.; KERRFOOT, S.M. Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. **News Physiol. Sci**., v.16, n.2, p.76-80, abr., 2001

KUBES, P. The complexities of leukocyte recruitment. **Semin Immunol**., v.14, n.2, p.65-72, abr., 2002.

KUERTEN, S.; ANGELOV, D. Comparing the CNS morphology and immunobiology of different EAE models in C57Bl/6 mice: A step towards understanding the complexity of multiple sclerosis. **Annals of anatomy**, v. 190, n.1, p. 1-15, 2008.

LAKHAN, S. E.; ROWLAND, M. Whole plant cannabis extracts in the treatment of spasticity in multiple sclerosis: a systematic review. **BMC Neurology**, v.9, n.59, p.71-77, dez., 2009.

LANA-PEIXOTO, M. A. *et al*. Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da esclerose múltipla: III. Diretrizes baseadas em evidências e recomendações. **Arquivo de neuropsiquiatria**, v. 60, n.3-B, p.881-886, set., 2002.

LIMA, E. P. *et al*. Heterogeneidade dos déficits cognitivo e motor na esclerose múltipla: um estudo com a MSFC. **Psico**, v.39, n.3, p.371-381, 2008.

LIUA, Q. *et al*. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences,** v.61, n.24, p.3057–3075, dez., 2004.

LUBLIN, F. D.; REINGOLD, S. C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. **Neurology**. v.46, n. 4, p.907-11, abr., 1996.

LUTTEROTTI, A.; BERGER, T.; REINDL, M. Biological markers for multiple sclerosis. **Current medical chemistry**, v.14, n.18, p.1956-1965, 2007.

MACKENZIE-GRAHAN, A. *et al.* Purkinje cell loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neuroimage**, v.48, n.4, p.637-651, dez., 2009.

MAIONE, S. *et al*. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. **British Journal of Pharmacology**, v.162, n.3, p. 584–596, fev., 2011.

MALFAIT, A. M. *et al*. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. **PNAS**, v. 97, n. 17, p. 9561–9566 ,ago. ,2000.

MALFITANO, C. A. M.; PROTO, M. C.; BIFULCO, M. Cannabinoids in the management of spasticity associated with multiple sclerosis. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.4, n. 5, p. 847–853, 2008.

MARCHI, N. *et al*. Blood–brain barrier damage, but not parenchymal white blood cells, is a hallmark of seizure activity. **Brain Res**, v.1353, p.176–186, 2010.

MARESZ, K. *et al*. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. Nature ,medicine, v. 13, n. 4, p 492-497, abr., 2007.

MARTIN-MORENO, A. M. *et al*. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation *in vitro* and *in vivo*: relevance to Alzheimer's disease. **Molecular Pharmacology**, v.79, n. 6, p. 964-73, jun., 2011.

MCDONALD, W. I. *et al*. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. **Annual Neurology**, v.50, n.1, p. 121–127, jul., 2001.

MCDONALD, W. I.; RON, M. A. Multiple sclerosis: the disease and its manifestations. **Philosophical transactions of the Royal Society**, v.352, n.1390, p.1615-1622, out., 1999.

MCGAVERN, D. B. Quantitative assessment of neurologic deficits in a cronic progressive murine model of CNS demeylination. **Experimental neurology**, v.158, n.1 p.171-181, jul., 1999.

MCQUALTER, J. L.; BERNARD, C. C. A. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. **Journal of neurochemistry**, v.100, n.2, p.295-306, jan., 2007.

MECHA, M. *et al*. Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. **Cell Death and Disease**, v.3, e331, jun., 2012.

MESTRE, L. *et al.* A cannabinoid agonist interferes with the progression of a chronic model of multiple sclerosis by downregulating adhesion molecules. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 40, n. 2, p. 258–266, fev., 2009.

MIX, E.; MEYER-RIENECKER, H.; ZETTL, U. K. Animal models of multiple sclerosis for the developmenet and validaion of novel therapies-potecial and limitations. **Journal of Neuroscience**, v.255, s.6, p.7-14, dez., 2008.

MORGAN, L. *et al*. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. **Neuroscience**, v.147, n.3, p. 664–673, jul., 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric asay for cellular growth and survival: Application to proliferation and citotoxicty assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MS AUSTRÁLIA. For health professionals: Pain and multiple sclerosis (MS). Disponível em: www.msaustralia.org.au. Acesso em: 28 nov. 2012.

NESSLER, S.; BRUCK, W. Advances in multiple sclerosis research in 2009. **Journal of neurology**, v.257, n.9, p. 1590-1593, set. 2010.

NI, X. *et al*. Win 55212-2, a cannabinoid receptor agonist, attenuates leukocyte/ endothelial interactions in an experimental autoimmune encephalomyelitis model. **Multiple Sclerosis**, v.10,n. 2, p.158-164, abr., 2004.

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

OKSENBERG, J. R.; BARANZINI, S. E. Multiple sclerosis genetics—is the glass half full, or half empty?. **Nature reviews: neurology**, v.6, n. 8, p. 429-437, ago., 2010.

OLECHOWSKI, C, J.; TRUONG, J. J.; KERR, B. J. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Pain,** v.141, n. 1-2, p.156–164, jan., 2009.

PALAZUELOS, J. *et al*. The CB2 cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: Involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. **The journal of biological chemistry**, v. 283, n 19, p. 13320–13329, maio, 2008.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PERKIN, G. D.; WOLINSKY, J. S. **Multiple sclerosis**. Oxford: Health press, 2000.

PETROCELLIS, L.; CASCIO,M. G., DI MARZO, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. **British Journal of Pharmacology** , v. 141, n.5, p. 765–774, mar., 2004.

PIERSON, E. *et al*. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. **Immunological Reviews**, v. 248, n.1, p.205–215, jul., 2012.

PRYCE, G. *et al*. Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. **Brain**, v. 126, n. 10, p. 2191-2202, out., 2003.

PRYCE, G.; BAKER, D. Control of spasticity in a multiple sclerosis model is mediated by CB1, not CB2, cannabinoid Receptors. **British Journal of Pharmacology** , v. 150, n.4, p. 519–525, fev., 2007.

RAJESH, M. *et al*. Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 293, n.1, p. 610–619, jul., 2007.

RAJESH, M. *et al*. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. **Journal of the american college of cardiology**, v. 56, n. 25, p. 2115–2125, dez., 2010.

RODRIGUES, D. H.; SACHS, D.; TEIXEIRA, A. L. Mechanical hypernociception in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Arquivo Neuro-Psiquiatria,** v.67, n.1, p.78-81, mar., 2009.

ROG, D. J. *et al*. Randomized, controlled trial of cannabisbased medicine in central pain in multiple sclerosis. **Neurology**, v.65, n.6, p.812-819 ,set., 2005.

RUIZ-VALDEPEÑAS, L. *et al*. Cannabidiol reduces lipopolysaccharide-induced vascular changes and inflammation in the mouse brain: an intravital microscopy study. **Journal of Neuroinflammation** , v. 8, n. 5, p.2-9, jan. , 2011.

SACERDOTE, P. *et al*. The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, v. 159, n.1-2, p. 97– 105, fev., 2005.

SANCHEZ, C.; VELASCO, G.; GUZMÁN, M. Metabolic stimulation of mouse spleen lymphocytes by low doses of Δ^9-tetrahydrocannabinol. **Life Sciences**, v. 60, n. 19, p. 1709-1717, abr., 1997.

SÁNCHEZ, A. J. *et al*. R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)-pyrrolo-[1,2,3-de]-1,4 benzoxazin-6-yl]-1-naphtalenylmethanone (WIN-2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces encephalitogenic T cell apoptosis: partial involvement of the CB2 receptor. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n.12, p.1697 – 1706, dez., 2006.

SANTOS, A.C. *et al*. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis—an intravital microscopy study. **Journal of Neuroimmunology**, v. 162, n.1-2, p. 122–129, maio, 2005.

SARIA, A.; LUNDBERG, J. M. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. **Journal Neuroscience Methods,** v. 8, n. 1, p. 41-9, maio, 1983.

SCUDERI, C. *et al*. Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. **Phytotherapy research**, v.23, n.5, p. 597– 602, maio, 2009.

SMITH,K. J.; KAPOOR, R.; FELTS, P. A. Demyelination: The role of reactive oxygen and nitrogen species**. Brain Pathology**, v. 9, n.1, p. 69-92, jan., 1999.

SVENDSEN, K. B.; JENSEN, T. S.; BACH, F. W. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. **BMJ,** v. 329, n. 7460, p. 253- 261 , jul., 2004.

THOMAS, A. . *et al*. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v.150, n.5, p. 613–623, mar., 2007.

TRAPP, B. D.; NAVE, K. A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?. **Annual Review of Neuroscience**, v.31, p.247–69, jul., 2008.

VAJKOCZY, P.; LASCHINGER, M.; ENGELHARDT, B. Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. **Journal of clinical investestigation**, v.108, n.4, p. 557-65, ago., 2001.

VIEGAS, A. P. C. *et al.* Prevention by celecoxib of secondary hyperalgesia induced by formalin in rats. **Life Sciences**, v. 75, n.23, p. 2807–2817, out., 2004.

VIEGAS, F. C. S. **Estudo clínico-histopatológico da encefalomielite auto-imune experimental em camundongos selvagens e deficientes para a apolipoproteína-E**. 2009. Tese (Mestrado em biologia celular) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2009.

WADE, D. T . *et al*. Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo controlled study on 160 patients. **Multiple Sclerosis**, v.10, n.4, p.434-441, ago., 2004.

WARD, S. J. *et al*. Cannabidiol Prevents the Development of Cold and Mechanical Allodynia in Paclitaxel-Treated Female C57Bl6 Mice. **Anesthesia & analgesia**, v.113, n. 4 , p. 947-950, out., 2011.

WEBER, M. S.; HEMMER, B.;CEPOK, S. The role of antibodies in multiple sclerosis.

Biochimica et biophysica acta: molecular basis of disease, v. 1812, n. 2, p.239-245 fev., 2011.

WEKERLE, H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. **Annals of rheumatic disease**, v. 67, s. III, p. 56-60, jul., 2008.

WU, H. Y. *et al*. Cannabidiol-induced apoptosis in primary lymphocytes is associated with oxidative stress-dependent activation of caspase-8. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 226, n.3, p.260–270, fev., 2008.

ZAJICEK, J. P. *et al*. Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 362, n. 9395, p.1517-1526, nov., 2003.

ZAJICEK, J. P. *et al*. Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. **Journal Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 76, n.12, p.1664–1669, dez., 2005.