

SARA ALVES FERREIRA

**EFEITO DO SILDENAFIL[®] NO SISTEMA NERVOSO
PERIFÉRICO E NA MUSCULATURA ESTRIADA
ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
BRAGANÇA PAULISTA

2015

SARA ALVES FERREIRA

**EFEITO DO SILDENAFIL[®] NO SISTEMA NERVOSO
PERIFÉRICO E NA MUSCULATURA ESTRIADA
ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA

PROF.DRA. THALITA ROCHA

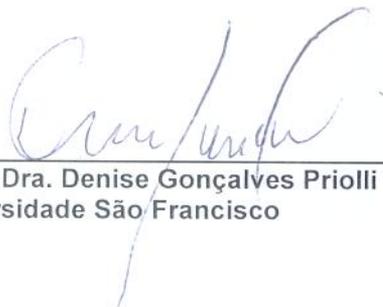
UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
BRAGANÇA PAULISTA

2015

FERREIRA, A., Sara, “Efeito do Sildenafil® no sistema nervoso periférico e na musculatura estriada esquelática de camundongos em modelo experimental de esclerose múltipla”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e seis de fevereiro de 2015 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Thalita Rocha
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Denise Gonçalves Priolli
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Celena Maria Zani de Souza
Universidade São Francisco

DEDICATÓRIA

A Deus e Nossa Senhora.
Aos meus filhos Alexandre, Juliana, Felipe e Matheus, meus amores e minha vida.

AGRADECIMENTOS

Durante este trabalho de mestrado estiveram envolvidas várias pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua realização. Agradeço a todas elas pela convivência, auxílio, compreensão e amizade.

A minha orientadora Profa. Dra. Thalita Rocha, pelo exemplo de profissionalismo, por todos os desafios lançados, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e incentivo, e por ter confiado e acreditado na minha capacidade e força de trabalho.

Agradeço aos professores que contribuíram com seus ensinamentos e orientações, além de compartilharem suas experiências valiosas comigo.

A Profa. Dra. Denise Priolli pelo carinho e palavras de apoio nas condições mais adversas.

Aos meus amigos, Armando de Oliveira, Mauro Terra, Michael Kenney, António Batista. As minhas amigas, Iriana Terra e Malu Dezani, pela paciência e compreensão, pelo companheirismo e apoio, em todos os momentos.

Aos alunos da Iniciação Científica por me ajudarem e apoiarem nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Secretária de Pós-graduação Stricto Sensu da Universidade São Francisco, em especial a Vilma Ap. Tescke e a Tatine M. de Oliveira pela atenção e o carinho que me dedicaram.

Ao meu amigo e companheiro de jornada Jetro Sguarezi.

Aos meus filhos, Alexandre, Juliana, Felipe e Matheus pela paciência que tiveram com a mãe no decorrer destes dois anos.

Aos meus pais pela educação e pela criação, que apesar das dificuldades, nunca foi abalada.

Agradeço ao apoio financeiro da CAPES e à Universidade São Francisco pela bolsa concedida, infraestrutura e equipamentos.

Aos animais, que mesmo sem querer ou entender o porquê, foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A Deus, pela realização de mais um sonho.

*“Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune na qual há uma inflamação crônica no Sistema Nervoso Central (SNC). Os medicamentos utilizados no tratamento visam diminuir a neuroinflamação, podendo agir diretamente evitando a desmielinização. Na busca por novos fármacos, pesquisas realizadas em modelo experimental animal propõem a ação do Sildenafil[®] como possível coadjuvante no tratamento da EM por apresentar ação anti-inflamatória no SNC. Pouco se sabe sobre as alterações morfofuncionais no Sistema Nervoso Periférico (SNP), na musculatura estriada esquelética (MEE) e na junção neuromuscular (JNM) durante a EM. Desta forma o objetivo do presente estudo foi investigar, por histoquímica e imunofluorescência (IF), o efeito protetor do Sildenafil[®] no SNP. Para tanto, camundongos C57bL6 (n=5; 4 semanas) foram imunizados segundo o modelo experimental de Encefalomielite Autoimune (EAE), submetidos (grupo EAESC) ou não (grupo EAE) à injeção intraperitoneal de 0,2mL de Sildenafil[®] (25mg/kg em 2mL de salina 0,9%). Animais naïve constituíram o grupo N e animais tratados apenas com Sildenafil[®] constituíram o grupo SC. À microscopia óptica (HE; TM) não foram observadas alterações morfológicas, fibrose ou infiltrado inflamatório em todos os grupos estudados. Foram observados edema e expressão de TNF α na região do perímio dos músculos gastrocnêmios dos animais dos grupos SC, EAE e EAESC. A expressão de F4/80 foi positiva apenas nos grupos EAE e EAESC. A IF para a proteína S100 foi intensamente positiva para o grupo N e SC, negativa para EAE e fracamente positiva para EAESC. Já a marcação para as proteínas da JNM (sinaptofisina, sinaptobrevina e syntaxina) foi positiva para todos os grupos, com visível diminuição na marcação da proteína SNAP25 nos grupos EAE e EAESC. A marcação para o receptor de acetilcolina, na membrana pós-sináptica (via α BgTx) foi positiva em todos os grupos. Os resultados indicaram que houve neuroinflamação do SNP, com alteração da mielinização e de parte do aparato necessário a exocitose de acetilcolina, no modelo EAE. O Sildenafil[®] apresentou ação protetora evitando a neuroinflamação e a desmielinização.

Palavras chave: neuroinflamação, Células de Schwann, Viagra, imunofluorescência, junção neuromuscular.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammation of the Central Nerve System (CNS). The drugs used for treatment aim to reduce neuroinflammation and can directly prevent demyelination. Seeking for new drugs, researches using experimental animal model suggested that Sildenafil[®] could possibly be an adjuvant in the treatment of MS because of its anti-inflammatory activity in the CNS. Few is known about the morphological changes of the peripheral nerve system (PNS), skeletal muscles (SM) and neuromuscular junction (NMJ) in MS. For these reasons, the objective of this study was to investigate, by histochemistry and immunofluorescence (IF), the protective effect of Sildenafil[®] into the PNS. Therefore, C57BL6 mice (n = 5; 4 weeks) were immunized according to the experimental model of autoimmune encephalomyelitis (EAE), submitted (Group EAESC) or not (Group EAE) to intraperitoneal injection of 0.2 mL of Sildenafil[®] (25 mg/kg in 2 mL saline 0.9 %). Naïve animals were used for control group (N) and animals treated only with Sildenafil[®] constituted the group SC. Light microscopy analysis (HE and TM) showed that morphological changes, as fibrosis and inflammatory infiltrate, were absent in all groups. Edema and TNF α expression were observed into the perimysium of gastrocnemius muscles of SC, EAE and EAESC animals. The expression of F4/80 was positive only for EAE and EAESC groups. IF of S100 protein was highly intense for N and SC animals, negative for EAE and weakly intense for EAESC groups. Regarding the proteins of the NMJ (synaptophysin, synaptobrevin and syntaxin) the immunoreaction was positive for all groups, with visible decrease in marking of SNAP25 protein of EAE and EAESC groups. Considering acetylcholine receptor in the postsynaptic membrane (α BgTx), the reaction was positive for all groups. The results showed, for EAE model, neuroinflammation and demyelination of the PNS, with changes in part of the exocytosis apparatus. The Sildenafil[®] displayed a protective effect avoiding neuroinflammation and demyelination.

Keywords: neuroinflammation, Schwann cells, Viagra, immunofluorescence, neuromuscular junction.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - acetilcolina

ACTH - hormônio adenocorticotrófico

α BgTx - alfa Bungarotoxina

BHE - barreira hematoencefálica

C57bl6 - linhagem de camundongo

CD58 - molécula associada à função de antígeno do linfócito

CEUA-CPqAM - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Osvaldo Cruz

CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CTLA-4 - proteína tipo 4 associada a linfócito citotóxico

EAE - Encefalomielite Autoimune Experimental

EAESC - Encefalomielite Autoimune Experimental + Sildenafil[®]

EM - Esclerose Múltipla

EMPP - Esclerose Múltipla Primária Progressiva

EMRR - Esclerose Múltipla Remitente Recorrente

EMSP - Esclerose Múltipla Secundária Progressiva

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

GMPc - Monosfosfato cíclico de guanosina

GTP - Guanosina trifosfato

HE - Hematoxilina-Eosina

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HLA - antígeno de histocompatibilidade leucocitário humano

HTLV-1 - vírus linfotrópico da célula humana tipo 1
HTLV-2 - vírus linfotrópico da célula humana tipo 2
HHV-6 - vírus humano de herpes tipo 6
IF - imunofluorescência
IFN γ - Interferon gama
IFN β - Interferon Beta
IgG - imunoglobulina G
IL - interleucina
IL-1 - interleucina 1
IL-7 - interleucina 7
IL-2 - interleucina 2
IL-10 - interleucina 10
JNM - Junção Neuromuscular
LCE - Líquido Cerebroespinal
MEE - Musculatura Estriada Esquelética
MCH - moléculas do complexo de histocompatibilidade
MOG - glicoproteína de mielina de oligodendrócito
NO - óxido nítrico
PBS - tampão fosfato-salina
PDE5 - fosfodiesterase tipo 5
PT - Toxina Pertussis
RM - Ressonância Magnética
RNM - Ressonância Nuclear Magnética

S100 - proteína S100

SNAP25 - proteína sinaptossomal associada com 25 KDa

SNARE - *Soluble NSF Attachment Receptor*

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

TAC - Tomografia Axial Computadorizada

TACT - Transplante Autólogo de Células Tronco

TCR - complexo receptor de antígeno de células T

TM - Tricrômico de Masson

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

TRITC - isotiocianato de tetrametilrodamina

t-SNARE - *Target SNARE*

VAMP - proteína de membrana associada à vesícula sináptica

VEB - Vírus Epstein-Barr

v-SNARE - *Vesicular SNARE*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Prevalência mundial de esclerose múltipla por 100 mil habitantes. 9
(Fonte: Editoria de arte/folhapress)
- Figura 2:** A) Ressonância Nuclear Magnética (RNM) mostrando acometimento periventricular (seta). (Fonte: mri.ifsc.usp.br) B) Peça anatômica mostrando lesão na substância branca (seta). (Fonte: anatpat.uincamp.br) 12
- Figura 3:** Quadro de efeitos gerais do Sildenafil[®]. (Fonte: Versatile effects of Sildenafil: recent pharmacological applications. Subramaniam et al., 2007) 16
- Figura 4:** Esquema ilustrativo de uma junção neuromuscular, indicando a área de sinapse. (Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-sistema-nervoso/imagens/sinaps16.jpg>) 18
- Figura 5:** Representação esquemática do complexo SNARE, sinaptobrevina (VAMP), sintaxina (syntaxin) e SNAP25. (Fonte: trafegandointracel.blogspot.com 1186x1286) 20
- Figura 6:** Gráfico com os dados do score clínico dos animais submetidos à imunização por MOG35-55; tratados ou não com Sildenafil[®]. 23
- Figura 7:** Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à técnica Hematoxilina-Eosina, para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Fibras musculares com morfologia preservada (formato hexagonal), miofilamentos dispostos de forma homogênea por todo o sarcoplasma, núcleos periféricos (seta). Observar edema tecidual na região de perímio (*) nos grupos Sildenafil, EAE e EAESC (B-D), sem infiltrado inflamatório. Aumento: 400x. 26

Figura 8: Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à técnica Tricrômico de Masson, para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Fibras musculares com morfologia preservada (formato hexagonal), miofilamentos dispostos de forma homogênea por todo o sarcoplasma, núcleos periféricos (seta). Não foi observado fibrose e infiltrado inflamatório em nenhum dos grupos experimentais. Aumento: 400x. 27

Figura 9: Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da citocina TNF α , para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Observar imunomarcação positiva nos grupos Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D) na região de endomísio e perimísio, evidenciando a expressão desta citocina pelas células residentes do tecido conjuntivo (*). Não há expressão de TNF α pelas fibras musculares em nenhum dos grupos experimentais. Aumento: 400x. 28

Figura 10: Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína F4/80, para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Observar imunomarcação positiva nos grupos EAE (C) e EAESC (D), evidenciando a presença de macrófagos (*) no tecido conjuntivo. Aumento: 400x. 29

Figura 11: Cortes histológicos de nervos (quadros) associados aos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína S100, para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Observar imunomarcação fortemente positiva nos grupos naïve (A) e Sildenafil (B). Não há marcação para o grupo EAE (C), porém a marcação é fracamente observada no grupo EAESC (D), 30

evidenciando a possíveis alterações nas Células de Schwann. a – arteríola; v – vênula. Aumento: Aumento: 100x.

Figura 12: Cortes histológicos de músculos gastrocnêmios de 31 camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína sinaptofisina (A, C, E, G) e α BgTx (B, D, F, H) para os grupos naïve (A, B), Sildenafil (C, D), EAE (E, F) e EAESC (G, H). Notar a presença dos receptores para acetilcolina preservados na membrana pós-sináptica (sarcolema) da junção neuromuscular (FITC). Observar imunomarcação positiva da sinaptofisina para todos os grupos. Aumento: 400x.

Figura 13: Cortes histológicos de músculos gastrocnêmios de 32 camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína sinaptobrevina (A, C, E, G) e α BgTx (B, D, F, H) para os grupos naïve (A, B), Sildenafil (C, D), EAE (E, F) e EAESC (G, H). Notar a presença dos receptores para acetilcolina preservados na membrana pós-sináptica (sarcolema) da junção neuromuscular (TRITC). Observar imunomarcação positiva da sinaptobrevina para todos os grupos. Aumento: 400x.

Figura 14: Cortes histológicos de músculos gastrocnêmios de 33 camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína SNAP25 (A, C, E, G) e α BgTx (B, D, F, H) para os grupos naïve (A, B), Sildenafil (C, D), EAE (E, F) e EAESC (G, H). Notar a presença dos receptores para acetilcolina preservados na membrana pós-sináptica (sarcolema) da junção neuromuscular (TRITC). Observar imunomarcação da SNAP25 fortemente positiva no grupo naïve (A), moderadamente positiva no grupo Sildenafil (C) e fracamente positiva para os grupos EAE (E) e EAESC (G). Aumento: 400x.

Figura 15: Cortes histológicos de músculos gastrocnêmios de 34 camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína

sintaxina (A, C, E, G) e α BgTx (B, D, F, H) para os grupos naïve (A, B), Sildenafil (C, D), EAE (E, F) e EAESC (G, H). Notar a presença dos receptores para acetilcolina preservados na membrana pós-sináptica (sarcolema) da junção neuromuscular (TRITC). Observar imunomarcção da sintaxina positiva para todos os grupos. Aumento: 400x.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de anticorpos. 21

Tabela 2: Sumário de Resultados. 35

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1. Histórico	3
2.2. Etiopatologia	5
2.3. Epidemiologia	8
2.4. Manifestações Clínicas	9
2.5. Diagnóstico	11
2.6. Tratamento	13
2.7. Sildenafil®	15
2.8. Sistema Nervoso Periférico	17
3. Objetivos	20
4. Material e Métodos	21
4.1. Reagentes	21
4.2. Animais	22
4.3. Protocolos de indução da EM	22
4.4. Protocolo de tratamento com Sildenafil®	23
4.5. Histopatologia	24
4.5.1. Histoquímica – HE	24
4.5.2. Histoquímica – Tricrômico de Masson (TM)	24
4.5.3. Imunofluorescência (IF)	25
5. Resultados	25
6. Discussão	36
7. Conclusão	41
8. Referências Bibliográficas	42

1. INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença multifatorial, inflamatória, crônica, do Sistema Nervoso Central (SNC) de natureza autoimune, que acomete principalmente jovens entre 20 e 40 anos de idade, sendo mais frequentes nas mulheres, sugerindo uma possível ação dos hormônios femininos (Sospedra e Martin, 2005). O primeiro relato de caso foi registrado no século XIV e incluiu sintomas e dados de necropsias que mostraram lesões no SNC em forma de placas, fatos estes que teriam dado origem ao termo esclerose em placas ou EM. Tais lesões resultam da resposta imunológica aos componentes da bainha de mielina presente nos oligodendrócitos (Kumar et al., 2005).

Os nervos ópticos, a substância branca periventricular e a medula espinal são as áreas do SNC em que mais se encontram lesões (Goldman e Aussiello, 2005). Segundo a literatura atual, os nervos periféricos não são afetados, provavelmente, porque a reação imunitária que danifica as células gliais seja específica para os antígenos dos oligodendrócitos e não para as Células de Schwann (Junqueira e Carneiro, 2013; Guyton e Hall, 2011).

Embora seja uma doença predominante da substância branca, as lesões podem ocorrer em todo o parênquima do SNC, incluindo a substância cinzenta. Estudos utilizando imagem de ressonância nuclear magnética (RNM) mostram inflamação e neurodegeneração na substância cinzenta, com infiltrados inflamatórios perivasculares muito semelhantes aos observados na substância branca (Lucchinetti et al., 2011).

No início da doença, os mecanismos de neuroplasticidade contribuem para a recuperação completa ou parcial dos sintomas, como por exemplo, fraqueza nos membros inferiores, distúrbios sensoriais, neurite ótica, diplopia e ataxia. Entretanto, durante o curso da doença, as áreas repetidamente afetadas desenvolvem alterações patológicas permanentes e a grande maioria dos pacientes evolui para um quadro de piora progressiva das funções neurológicas, com importante grau de incapacidade; disfunção urinária, fadiga, fraqueza, dor, vertigem e espasmos, déficits cognitivos, como

perda de memória, déficit de atenção, dificuldade em solucionar problemas e lentidão de raciocínio (Moseman et al., 2004).

São poucos os estudos no Brasil sobre a prevalência da EM. Dados de 2001 indicam que na cidade de São Paulo a doença acomete 15 em cada 100.000 habitantes. Tais casos vêm crescendo a cada ano, talvez pelo aumento da doença na população ou melhora no diagnóstico (Callegaro et al., 2001). A maior prevalência de EM se dá nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, nos quais são relatados mais de 100 casos a cada 100.000 habitantes (Kenealy et al., 2003).

No Brasil é a portaria nº 1323 de 2013 do Ministério da Saúde que aprova o protocolo clínico de diretrizes terapêuticas da EM e o tratamento se baseia em ensaios clínicos da década de 1990. Entretanto, já existem estudos que propõe diferentes tratamentos. O Interferon-beta (IFN β) é o fármaco de referência no tratamento da EM (Kraus e Oschmann, 2006). Outro fármaco, o acetato de glatiramer, demonstra eficácia em 34% dos casos e 34,7% de redução de novas lesões e é indicado nos casos de Esclerose Múltipla Remitente Recorrente (EMRR) refratários ao IFN β . Se após a troca de medicamento persistirem os surtos e a progressão da doença, recomenda-se o natalizumabe (Kraus e Oschmann, 2006).

Mesmo que os mecanismos imunológicos e inflamatórios da EM estejam elucidados, o uso de imunossupressores, que é uma das opções de tratamento, não apresenta sucesso clínico satisfatório (Nunes et al., 2012). Tais aspectos têm influenciado a busca por novos fármacos. Neste sentido o Sildenafil[®] vem sendo estudado e se mostra como uma nova opção terapêutica.

O Sildenafil[®] atua como um inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5). A PDE5 degrada o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que atua como segundo mensageiro, ativando proteínas cinases. As vias do GMPc, dentre elas a do óxido nítrico (NO), protegem os oligodendrócitos e modulam as reações dos astrócitos e da micróglia. Logo, a inibição seletiva do PDE5 aumenta os níveis de GMPc no cérebro, modulando a neuroinflamação e protegendo os oligodendrócitos dos eventos autoimunes (Ballard et al., 1996).

Modelos experimentais, como a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) em camundongos, têm sido propostos para melhor entendimento da EM. No modelo

EAE os animais são imunizados com, uma glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG), e com a toxina Pertussis (PT), isolada da bactéria *Bordetella pertussis*, que é um pequeno cocobacilo Gram-negativo causador da tosse convulsiva, em adjuvante de Freund (Bernard e Carnegie, 1975). Após 10 dias de imunização, esses animais apresentam perda de tônus da cauda, seguido de paralisia das patas traseiras e posteriormente das patas dianteiras. Normalmente, após 2 ou 3 dias do pico da doença os sintomas são amenizados e oscilam como na forma de surto remissão, indefinidamente (Bernard e Carnegie, 1975).

O modelo EAE é adequado para o estudo da esclerose múltipla por apresentar um fenótipo parecido à doença em humanos, além da resposta autoimune contra antígenos de mielina no SNC, considerado, hoje, o principal mecanismo envolvido no início e progressão da EM (Glass et al., 2010).

Considerando a problemática da doença e visando seu melhor entendimento, principalmente no que tange ao SNP, o presente projeto pretendeu, através das técnicas de histoquímica e imunofluorescência, caracterizar a musculatura estriada esquelética e nervos em modelo EAE e avaliar o efeito protetor do Sildenafil® também no SNP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

O primeiro registro clínico de EM se deu na Holanda e refere-se à Santa Lidwina de Schiedam (1380-1433). Textos históricos revelam que ela era portadora de uma doença debilitante com características compatíveis com a EM. A doença da Santa Lidwina começou aos 16 anos, após ter sofrido uma queda enquanto patinava, quando passou a ter dificuldade em andar, cefaleias e odontalgias violentas. Aos 19 anos, ambas as pernas estavam paralisadas e sua visão diminuída. Durante os 34 anos seguintes a sua condição piorou lentamente, apesar de alguns períodos de remissão, até falecer aos 53 anos de idade (Medaer, 1979).

Cinco séculos se passaram até Jean-Martin Charcot, um eminente neurologista Francês do século XIX, estabelecer relações entre as alterações patológicas, vistas nas amostras *post-mortem*, com que o hoje se sabe ser consequência da EM (McDonald, 1993).

A primeira demonstração patológica foi descrita, pelos médicos europeus Robert Carswell e Jean Cruveilhier, como a presença de “placas marrons na face anterior da medula espinal” (Carswell, 1838;Cruveilhier, 1891).

Enquanto Carswell e Cruveilhier fundamentaram suas observações em necropsias, Friedrich Theodor Von Frerichs, na Alemanha, foi quem primeiro correlacionou as lesões patológicas aos achados clínicos. Em 1849, Von Frerichs publicou um relato muito parecido com os conceitos atuais da EM, enfatizando que a doença ocorria mais comumente em indivíduos jovens, com progressão lenta, inicialmente em um lado do corpo e, às vezes, com recorrências. Subsequentemente, seu discípulo Valentiner, em 1856, descreveu dois casos com evolução em surtos e remissões e presença de sintomas cognitivos (Moreira et al., 2002b).

Carl Rokitansky, em 1857, descreveu que as “placas” poderiam representar proliferação de tecido conjuntivo na medula espinal, ponte e bulbo, produzindo paraparesia progressiva. Eduard Rindfleisch, em 1863, foi o primeiro a focar as alterações perivasculares, influenciando assim as futuras idéias sobre a patogênese da doença (Moreira et al., 2002b).

No entanto a desmielinização e a astrocitose foram primeiramente descritas por Frommann em 1864 (Moreira et al., 2002a). O termo “esclerose em placas” foi introduzido por Edmé Félix Alfred Vulpian em 1866 (Vulpian, 1866). Em 1868, Charcot, baseado novamente em relato de caso de necropsia, relatou que a “esclerose em placas” apresentava lesões disseminadas no tempo e espaço, com manifestações clínicas, como tremor, fraqueza e dificuldade em andar, com períodos de quadro agudo e remissão; envolvimento da mielina principalmente na região periventricular, nervo óptico e medula espinal (Charcot, 1868).

Na América Latina, o primeiro registro da doença foi feito em 1923 pelo brasileiro Aluizio Marques (Marques, 1923). O paciente apresentava a forma clássica de Charcot, caracterizada por paralisia espástica, tremor, dificuldade na fala, movimentos rápidos e incontroláveis nos olhos. Também pioneiro no estudo da EM, Antônio Austregésilo foi um dos maiores pesquisadores sobre a doença. Em 1926 publicou o primeiro estudo neuropatológico da América Latina (Austregésilo e Costa Rodrigues, 1926).

2.2. Etiopatologia

Na etiologia da EM uma longa lista de agentes virais vem sendo implicada, com base, principalmente, em casos isolados, porém nunca confirmados pela literatura científica. Nela incluem-se o vírus da raiva, herpes simples, vírus parainfluenza1, vírus do sarampo, citomegalovírus e cornea vírus. Posteriormente a suspeita recaiu sobre retrovírus como o HTLV-1, HTLV-2 e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), afastada por estudos subsequentes. Na atualidade o herpes vírus humano tipo seis (HVH-6) tem sido apontado como possível agente desencadeador da doença (Moreira et al., 2002b). Alguns estudos mostram que o vírus Epstein-Barr desempenharia um papel na etiologia da EM, contudo os trabalhos epidemiológicos não são conclusivos, em parte pela alta prevalência de infecções prévias em indivíduos sem EM (Moreira et al., 2002b).

O conceito de EM como doença autoimune foi estabelecido em 1935 por Rivers e Schwentker, através da produção da indução da encefalomielite autoimune (EAE) por inoculação de tecido neural em macacos (Compston, 1999).

A EM é uma doença causada pela degeneração da camada lipídica que envolve os axônios do SNC, em decorrência da ação do sistema imune que produzirá anticorpos contra as células gliais, responsáveis pela produção da bainha de mielina (Contran et al., 2000). A ausência da bainha de mielina leva à degeneração dos neurônios e à perda de função (Junqueira e Carneiro, 2013; Guyton e Hall, 2011). Os nervos ópticos, a substância branca periventricular e a medula espinal e cervical são as áreas em que mais se encontram estas lesões (Goldman e Aussiello, 2005).

Segundo a literatura atual, os nervos periféricos não são afetados, provavelmente porque a reação imunitária que danifica os oligodendrócitos seja específica, não afetando as Células de Schwann que são responsáveis pela mielinização no SNP (Junqueira e Carneiro, 2013; Guyton e Hall, 2011) Tilbery e colaboradores (2000) observaram, em pacientes, ramos terminais do nervo motor com poucos núcleos de Células de Schwann e degeneração axoplasmática em áreas de atrofia muscular, com comprometimento da musculatura estriada esquelética.

A ação imunológica sobre as células nervosas promove, além da desmielinização, lesão axonal inflamatória. O processo imunopatológico é caracterizado pela infiltração perivascular de linfócitos e monócitos, com expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade (MCH) classe II nas lesões. Essa infiltração se dá através da ruptura da barreira hematoencefálica. Há liberação de quimiocinas, linfocinas e monocinas, mesmo na ausência de um processo inflamatório. São verificadas também anormalidades imunológicas no sangue e líquido cefalorraquidiano, como ativação humoral imune e alta frequência de linfócitos ativados (Goldman e Aussielo, 2005).

As infecções por vírus e bactérias também podem estar relacionadas com a patogênese, como infecções pelo VEB, HHV-6 e pela bactéria *Chlamydia pneumoniae* (Sriram et al., 2003).

Em indivíduos com susceptibilidade genética uma infecção viral no SNC pode levar um grande número de linfócitos T a atravessar a barreira hematoencefálica. Estes linfócitos destruirão o vírus e, erroneamente, a mielina, por antígenos apresentados pelas células gliais danificadas ou pela micróglia. Tal morte celular leva à liberação de mais proteínas da mielina e aumento da lesão, até que o sistema imunitário iniba os linfócitos agressores temporariamente, levando à remissão (Tortora e Grabowski, 2002).

Estudos genéticos têm sido realizados em alelos que apresentam relevância biológica para a doença, sendo os genes candidatos àqueles que codificam o antígeno leucocitário humano (HLA), imunoglobulinas, citocinas e seus receptores, quimiocinas, complexo receptor de antígeno de células tronco (CRT), e antígenos da mielina. O alelo HLA-DRB1*1501 está fortemente associado (16-60%) à EM na população caucasóide.

Dentre outros alelos de genes que têm sido associados à EM estão os fatores de crescimento, proteína tipo 4 associada a linfócito citotóxico (CTLA-4), fator de necrose tumoral (TNF), CD58 e receptores de interleucinas 17 e 2 (Svejgaard et al., 2008).

Acredita-se que, além de fatores genéticos, fatores ambientais, como a falta de exposição solar, também estão relacionados à doença. Nos últimos anos a deficiência de vitamina D tem sido associada ao desenvolvimento da EM uma vez que, após ser catabolizada, atua em linfócitos B, T e células dendríticas, através da ligação ao seu receptor VDR (Young, 2011; Milo e Kahana, 2010; Jelinek e Hassed, 2007).

Em nível macroscópico, as lesões aparecem como placas múltiplas, bem circunscritas, deprimidas, vítreas, cinzentas e de forma irregular, sendo divididas em placas ativas e inativas. Na placa ativa, verifica-se microscopicamente a degradação ativa da mielina, com abundantes macrófagos contendo resíduos ricos em lipídeos.

As células inflamatórias estão presentes como aglomerados perivascularares, os axônios relativamente preservados e os oligodendrócitos depletados. Na placa inativa, há pouca ou nenhuma mielina. Após os eventos iniciais, os oligodendrócitos imaturos tentam remielinizar os axônios. No entanto, esse processo é incompleto. Percebe-se uma diminuição dos núcleos dos oligodendrócitos, proliferação astrocítica e gliose (Kumar et al., 2011).

A EMRR é caracterizada por surtos de início súbito, mas de curta duração, seguidos por recuperação completa ou parcial, com sequelas mínimas. Não há progressão da doença fora dos períodos de surtos e o paciente pode ficar meses ou anos sem sinais da EM. A EMRR é responsável por 85 a 90% dos casos iniciais. No entanto, a maioria dos pacientes com EMRR que não se trata irá eventualmente entrar numa fase progressiva da doença, chamada Esclerose Múltipla Secundária Progressiva (EMSP) (Fox et al., 2006; Pedrosa et al., 2010).

A EMSP ocorre quando há agravamento da forma EMRR, geralmente 15 a 20 anos após o início da doença. Nesta forma, as crises se tornam mais frequentes e as sequelas começam a se acumular e evoluir com piora dos sintomas mesmo, sem haver crises agudas (Fox et al., 2006; Pedrosa et al., 2010).

Já a Esclerose Múltipla Primária Progressiva (EMPP) acomete cerca de 10% dos casos e é caracterizada pela progressão rápida da doença desde o início. O paciente pode não ter surtos, mas vai acumulando sintomas e sequelas. É muito comum em pacientes que desenvolvem EM após os 40 anos (Fox et al., 2006; Pedrosa et al., 2010).

Aproximadamente 85% dos pacientes apresentam a forma surto/remissão da doença, sendo que 15% dos pacientes apresentam a forma primária progressiva. Os surtos estão associados com o desenvolvimento de novas lesões focais identificadas por ressonância magnética nuclear. Após \pm 15 anos do diagnóstico, a maioria dos pacientes evolui para a forma secundária progressiva. A fase de surto e remissão é caracterizada por importante resposta inflamatória, embora se observe neurodegeneração. Na fase secundária progressiva pouca inflamação é observada com uma extensa neurodegeneração (Cella et al., 1999).

2.3. Epidemiologia

A EM é considerada uma doença de adultos jovens entre 20 e 40 anos de idade, predominante em indivíduos de cor branca e do sexo feminino (2:1). Estima-se que aproximadamente 300 a 350 mil pessoas são portadoras de EM nos Estados Unidos e 2,5 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo (Fox et al., 2006). A incidência na Europa também é alta, porém é baixa na América do Sul. No Brasil, na região Nordeste, a prevalência é de 10 casos por 100.000 habitantes (Ferreira et al., 2010) e na região Sudeste (dados de São Paulo, Santos, Belo Horizonte, Uberaba, Botucatu e Sorocaba) essa prevalência aumenta para 12 a 18 por 100.000 habitantes (Callegaro et al., 2001) (Figura 1).

Um estudo realizado na Clínica Neurológica da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo registrou 302 casos de EM durante 1980 a 1997. Nestes casos, constatou-se que a idade média dos pacientes foi de 37,7 anos, e o início da doença foi em média aos 29,6 anos. Com relação à etnia, verificou-se que

283 pacientes eram brancos (94%), 15 negros (5%) e 4 amarelos (1%). A doença apresentou-se, em 50% dos casos, na forma secundária e 50% na forma primariamente progressiva. Os sintomas iniciais mais comuns foram sensitivos (31,7%) e ópticos (26,8%) (Moreira et al., 2002a).

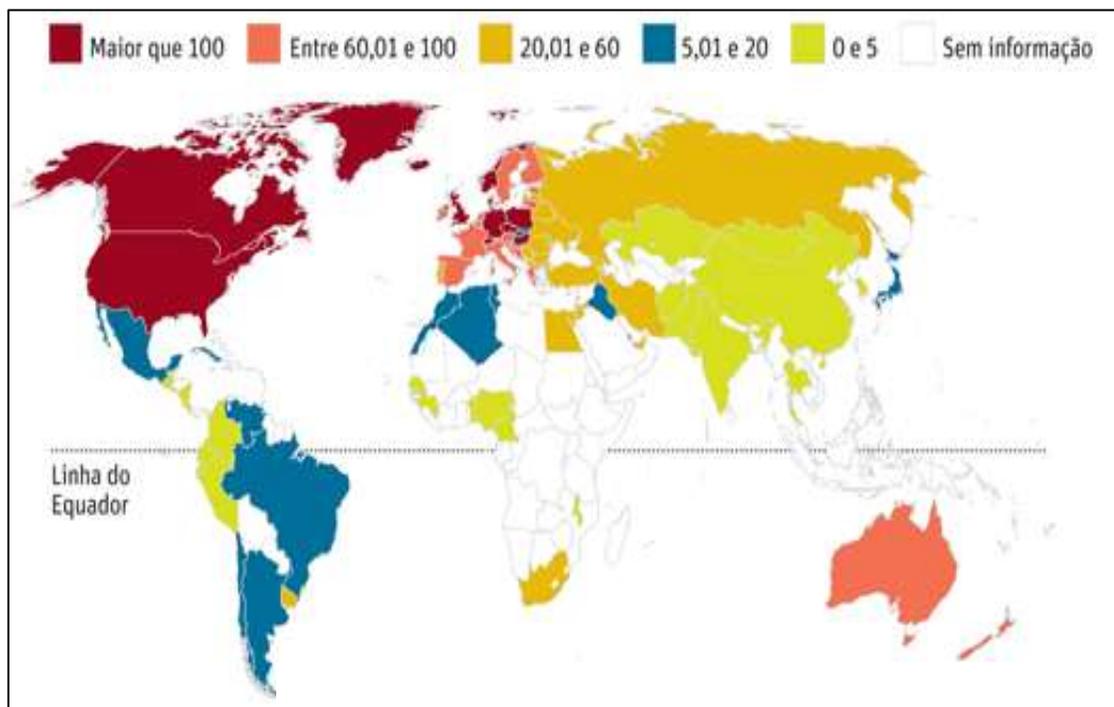


Figura 1: Prevalência mundial de esclerose múltipla por 100 mil habitantes. (Fonte: Editoria de arte/folhapress)

2.4. Manifestações Clínicas

O quadro clínico de EM depende, principalmente, da região do SNC afetada e é extremamente variável. Nos mais jovens, a doença pode ter início agudo e subagudo, comprometendo os nervos ópticos, tratos piramidais, medula, cerebelo, sistema vestibular central ou fascículo longitudinal medial (Bradley et al., 2014). Nos indivíduos mais velhos, inicia-se com uma mielopatia progressiva insidiosa associada a distúrbios

de marcha e comprometimento da bexiga urinária (Compston e Coles, 2008; Pavan et al., 2007). Apesar da multiplicidade de manifestações clínicas, os doentes apresentam, frequentemente, sintomas que indicam envolvimento dos sistemas motor, sensorial visual (Compston e Coles, 2008).

Estudos eletromiográficos/eletrofisiológicos de pacientes portadores de EM revelaram denervação periférica (Tilbery, 2005; Petajan, 1982).

As manifestações mais comuns incluem fadiga (40%), neurite ótica (22%), parestesia (21%), diplopia (12%), disfunção vesical (5%) e vertigem (5%) (Coles e Compston, 2008). Outras manifestações podem estar presentes, como déficit cognitivo, marcha atáxica, oftalmoplegia internuclear, espasticidade e depressão. Há relatos em que pacientes portadores de EM desenvolveram severa fraqueza no diafragma e consequente insuficiência respiratória (Pavan et al., 2007). O sinal de *Lhermittee* (sensação de choques que percorrem a coluna cervical com irradiação para membros superiores e inferiores quando se realiza flexão da coluna cervical) e o fenômeno de *Uhthoff* (alteração na condução nervosa decorrente ao aumento de temperatura verificada como escurecimento temporário da visão) correspondem a manifestações frequentes na EM. O calor intensifica os sintomas decorrentes das inflamações, podendo gerar um quadro de mal-estar generalizado e instabilidade (Compston e Coles, 2008).

Na EM, casos de morte como consequência direta da doença são raros. A causa mais comum de morte é uma broncopneumonia, após aspiração ou insuficiência respiratória (Miller, 2002). Outras causas incluem insuficiência cardíaca, afecções malignas, septicemia (úlceras de decúbito, infecções urinárias) e suicídio. Nas últimas décadas a sobrevivência média aumentou de 25 para 35 anos após o início, provavelmente em consequência do melhor tratamento das infecções e das úlceras de cúbito (O'Sullivan et al., 2004).

2.5. Diagnóstico

Verifica-se na literatura que os sinais e sintomas da EM variam consideravelmente em intensidade e duração podendo se desenvolver rapidamente ao longo de períodos de horas, meses ou anos (Almeida et al., 2007; Grisante e Stanich, 2006; O'Sullivan et al., 2004; Callegaro et al., 2001). De acordo com O'Sullivan e colaboradores (2004) os principais sinais/sintomas da doença são relacionados principalmente com a perda de uma função sensitiva ou motora.

Por varias décadas, o diagnóstico da EM foi baseado na história clínica e nos achados de exame físico, porém com o desenvolvimento tecnológico de métodos já existentes, como a imagem por ressonância magnética, o teste de potencial evocado, que consiste na avaliação da resposta do organismo a pequenos choques elétricos que estimulam os nervos ópticos ou músculos, e a pesquisa das bandas oligoclonais no líquido cefalorraquidiano (LCE), foi possível melhorar a sensibilidade no diagnóstico da doença. Entretanto, a falta de conhecimento preciso dos mecanismos fisiopatológicos, a ausência de achados clínicos específicos, a presença de sinais e sintomas variados e o extenso diagnóstico diferencial envolvido ainda dificultam, muitas vezes, o diagnóstico preciso da doença (Ferreira et al., 2004).

Segundo O'Sullivan (1993), o diagnóstico da EM baseia-se nos achados clínicos, evidências históricas (anamnese) e testes laboratoriais auxiliares. Os critérios clínicos utilizados incluem sinais múltiplos de disfunção neurológica ocorrentes em mais de uma ocasião e em mais de um lugar e que não podem ser atribuídos a outras causas. Já os testes laboratoriais incluem: punção lombar e análise do Líquido cefalorraquidiano (LCE), para observar alterações típicas em pacientes com EM com uma leve elevação nas proteínas e/ou linfócitos, além de uma elevação no nível de imunoglobulina G (IgG) acima dos valores normais; Tomografia Axial Computadorizada (TAC), para detecção de lesões múltiplas e durante as exacerbações agudas (Tilbery, 2005).

A imagem por Ressonância Magnética (RM), como mostra a (Figura 2), também tem sido utilizada no diagnóstico das lesões de EM sendo aparentemente mais sensível que a TAC na detecção de pequenas placas. Testes eletrofisiológicos também são úteis

para avaliar a presença de lesões, confirmadas por potenciais evocados visuais, auditivos e somatossensoriais. A velocidade de transmissão do impulso nervoso é medida e comparada com as velocidades normais e um tempo de condução diminuído é evidência de desmielinização (Tilbery, 2005).

Análise do hemograma de pacientes revela alterações na distribuição de linfócitos T e B, particularmente durante as exacerbações agudas. Relatos de aumento de linfócitos T ativados no sangue periférico demonstram uma ativação imune anormal ocorrente fora do SNC (Tilbery, 2005).

No Brasil, a portaria nº 1323 de 2013, do Ministério da Saúde, que aprova o protocolo clínico de diretrizes terapêuticas da EM, preconiza que o diagnóstico seja feito com base nos Critérios de McDonald revisados e adaptados. Estes critérios utilizam como dados a ocorrência de surtos e lesões características de desmielinização demonstradas através de RM do encéfalo. Devem ainda ser realizados alguns exames laboratoriais como o exame do LCE, exame anti-HIV e dosagem sérica de vitamina B12 para excluir outras doenças de apresentação semelhante à EM. O potencial evocado visual é exigido quando há dúvida a respeito do comprometimento do nervo óptico (Chaves et al., 2008).

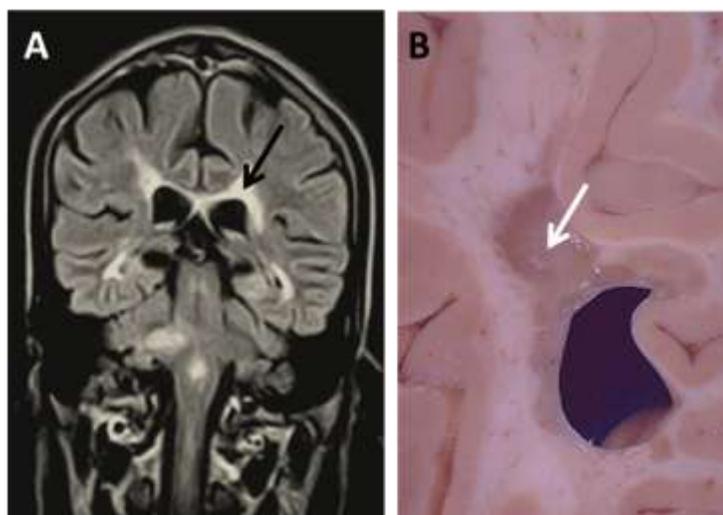


Figura 2: A) Ressonância Nuclear Magnética (RNM) mostrando acometimento periventricular (seta). (Fonte: mri.ifsc.usp.br). **B)** Peça anatômica mostrando lesão na substância branca (seta). (Fonte: anatpat.uincamp.br)

2.6. Tratamento

Atualmente, a EM vem sendo tratada com drogas imunossupressoras e imunomoduladoras que, respectivamente, reduzem e modulam as respostas imunes, interferindo assim na evolução da doença, com efeitos colaterais transitórios e passageiros (Tilbery e Peter, 2005). Entre elas estão os interferons (Avonex[®], Rebif[®] e Betaferon[®]) e o acetato de glatiramer (Copaxone[®]) (Mohr et al., 2004). O'Sullivan (1993) destaca que os imunossupressores como a azatioprina, a ciclofosfamida e a lomustina também vêm sendo utilizados. No entanto, se o uso destas drogas for interrompido, um aumento na taxa de recidivas é verificado, o que acabou limitando o seu uso (Thomson et al., 1994).

Um estudo realizado em 2002 utilizando o Betaferon[®] incluiu 372 pacientes portadores de EMRR que apresentaram pelo menos dois surtos nos 2 anos que antecederam a pesquisa. Após dois anos de seguimento, o tratamento com altas doses de Betaferon[®] reduziu a taxa anual de surtos e a severidade dos sintomas quando comparados com o placebo (Moreira et al., 2002a), evidenciando sua eficácia em reduzir os surtos e o surgimento das lesões visualizadas nos exames de ressonância magnética (Pedrosa et al., 2010).

Apesar dos avanços clínicos, os mecanismos de ação pelos quais o Betaferon[®] exerce seu efeito terapêutico na EM ainda não estão totalmente compreendidos. Além de possuir propriedades antivirais, este fármaco apresenta uma complexa atividade imunomoduladora, diminuindo as citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e aumentando as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Pedrosa, 2010).

O tratamento da primeira manifestação da doença ou de um novo surto também é realizado com o uso endovenoso de corticóides em altas doses. A metilprednisolona endovenosa é administrada na dose de 500 a 1000 mg/dia durante 3 a 5 dias, seguida pelo uso oral do corticoide em doses decrescentes por 2 semanas (Pedrosa et al., 2010).

Outro medicamento muito usado na terapêutica para as formas menos graves da EM é o acetato de glatiramer, conhecido comercialmente como Copaxone, utilizado por via subcutânea, diariamente, na dose de 20mg (Pedrosa et al., 2010).

Nas formas mais agressivas da doença, como a secundária progressiva, que muitas vezes não respondem aos medicamentos considerados “tradicionais”, têm-se utilizado o fármaco Natalizumab[®]. Este medicamento é um antagonista monoclonal da glicoproteína integrina $\alpha 4$, expressa em linfócitos e monócitos, essencial para o processo de migração através da barreira hematoencefálica. O principal mecanismo de ação do Natalizumab[®] é o bloqueio da migração de células inflamatórias, principalmente linfócitos, para o SNC (Pedrosa et al., 2010). Estudos demonstraram resultados promissores também com o uso do Ritoximab[®] e do Alentuzumab[®] na redução do número de lesões cerebrais na forma EMRR (Moreira et al., 2002b).

Embora haja uma série de fármacos disponíveis para o tratamento das diferentes formas da EM há pacientes que não respondem bem a essa farmacoterapia disponível. Diversos estudos têm sido realizados empregando o uso de células tronco como uma possível alternativa terapêutica (Karussis et al., 1992).

Estudos experimentais têm fornecido evidências de que o processo autoimune se dá contra os antígenos da bainha de mielina, direcionando o tratamento da EM ao uso de drogas que modifiquem esse processo inflamatório (Callegaro e Machiori, 2011).

Dietas baseadas na restrição de gordura ou suplementação com ácido linoléico não foram benéficas, nem mesmo a terapia em longo prazo com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), corticosteróides ou esteróides, já que estes não alteraram o curso da doença (Hier, 1984) e ainda podem provocar muitos efeitos adversos: necroses assépticas da cabeça do fêmur, imunossupressão, diabetes mellitus, osteoporose, atrofia muscular e alterações cutâneas (O’Sullivan, 1993).

Juntamente ao tratamento com imunossupressores, o transplante autólogo de células tronco (TACT) vem apresentando bons resultados. Setenta por cento dos pacientes melhoraram ou ficaram estáveis, sem a necessidade de qualquer tipo de

medicação, 30% não melhoraram e continuaram com a doença, sendo que 3 destas morreram (7%) resultado concluído foi que esta terapia pode ser viável, mas requer novas pesquisas (Van Gelder e Van Bekkum, 1996).

No Brasil, o tratamento se baseia em ensaios clínicos da década de 1990, mas já existem estudos que propõem diferentes tratamentos. O Interferon-beta (IFN β) é o fármaco de referência no tratamento da EM (Kraus. e Oschmann, 2006). Outro fármaco, o acetato de glatiramer, demonstra eficácia em 34% dos casos e 34,7% de redução de novas lesões e é indicado nos casos de EMRR, além do natalizumabe (Kappos et al, 2009; Kraus e Oschmann, 2006).

Dados experimentais em camundongos mostram que o Sildenafil[®] é capaz de induzir neurogênese, atuando como modulador da neuroinflamação e protetor da bainha de mielina, além de diminuir a microgliose e astrogliose e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IFN γ , IL1 β , IL-1-2, no SNC. (Nunes et al., 2012).

2.7. Sildenafil[®]

O Sildenafil[®], também conhecido como Viagra foi inicialmente sintetizado pela Indústria Farmacêutica Pfizer, no Reino Unido. A princípio, o foco da pesquisa era desenvolver uma droga para o tratamento de hipertensão e angina. No entanto, durante a fase 1 dos testes clínicos, além de não ter sido verificado um efeito anti-hipertensivo significativo, o Sildenafil[®] demonstrou um efeito farmacológico interessante nos pacientes com disfunção erétil. Desde então, foi considerado uma droga milagrosa e suas vendas movimentaram mais de 1 bilhão de dólares entre 1999 e 2001 (Jackson et al., 2005).

Este fármaco atua como inibidor da PDE5, que pertence a uma importante família de proteínas que regulam os níveis intracelulares de Guanosina Monofosfato Cíclica (GMPc) nas células. É eficaz no tratamento da disfunção erétil, por permitir uma

resposta erétil natural ao estímulo sexual por aumentar o efeito relaxador do (NO) no corpo cavernoso (Jackson et al., 2005).

O NO liberado nas terminações nervosas e nas células endoteliais ativa a enzima guanilato-ciclase a transformar em guaniosina trifosfato GTP, resultando em maior síntese de GMPc, que induz o relaxamento da musculatura lisa e trabecular do corpo cavernoso devido à diminuição de cálcio intracelular, causando um aumento do fluxo sanguíneo para o pênis aumentando a pressão peniana (Korolkovas, 1999; Langtry e Markham 1999; Morales et al., 1998; Damião et al., 1998).

A ação hidrolítica da PDE5 sobre o GMPc é encontrada em várias partes do organismo, como pulmões, plaquetas, musculatura lisa e cérebro. Sendo assim, muitas linhas de pesquisa tem demonstrado novas estratégias terapêuticas para dor, hipertensão pulmonar, problemas de memória causados por idade e até EM (Subramaniam et al., 2007) Os efeitos do sildenafil podem ser visualizados na (Figura 3).

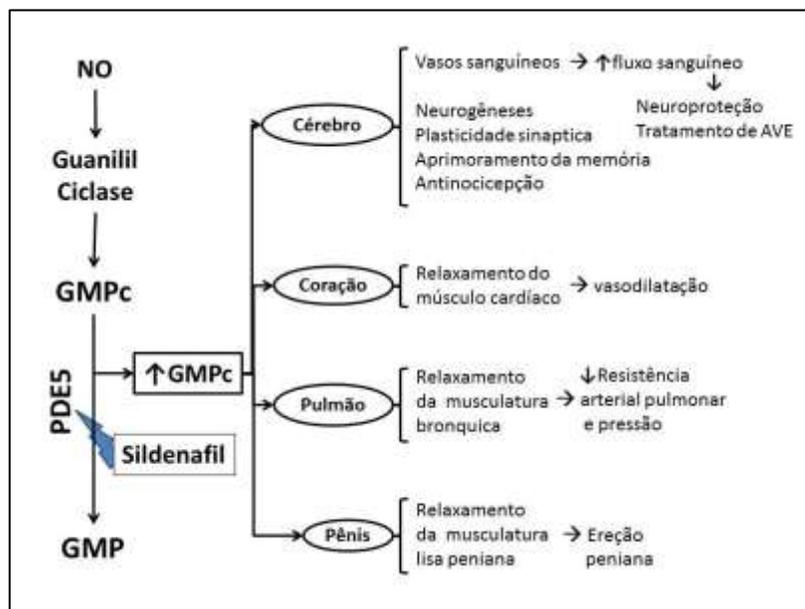


Figura 3: Quadro de efeitos gerais do Sildenafil®. (Fonte: Versatile effects of Sildenafil: recent pharmacological applications. Subramaniam, et al., 2007)

Na EM, especificamente, a administração de Sildenafil® tem mostrado um aumento significativo na perfusão cerebral e aumento da neurogênese, sugerindo um papel neuroprotetor na EM (Manson et al., 2005).

Novas evidências indicam que o NO e GMPc favorecem um resultado neuroprotetor no sistema nervoso central. O Sildenafil® induz neurogênese *in vitro* (Zhang et al., 2006) por aumentar os níveis de GMPc, que desempenha um papel importante na modulação da diferenciação de células tronco neurais. A redução dos níveis de GMPc resultaram em uma formação reduzida de neurônios e um aumento da formação de células não neuronais (Gómez-Pinedo et al., 2010).

Em ratos submetidos à ressecção bilateral de inervação dos corpos cavernosos e tratados com Sildenafil®, após 7 dias, houve uma redução na expressão gênica de fatores neurotróficos. Sabe-se que o dano ao nervo desencadeia uma cascata de eventos que inclui mudanças nos níveis de neurotransmissores, fatores neurotróficos e citocinas, os quais foram todos invertidos por tratamento com Sildenafil® (Hlaing et al., 2013).

2.8. Sistema Nervoso Periférico

O sistema nervoso central é o responsável pelo controle dos músculos esqueléticos. Ele regula a força muscular, variando as frequências dos impulsos transmitidos por neurônios motores inferiores. O complexo é constituído por um único nervo com seus múltiplos terminais e fibras musculares associadas e que são denominadas unidades motoras (Machado, 2007; Mc Ardle e Katch 1994; Bergman, 1989; Astrand e Rodahl, 1986).

As fibras nervosas se ramificam na extremidade para formar um complexo de terminações, isolado por uma camada de Células de Schwann, que se invagina na fibra muscular, formando a placa motora (Machado, 2007; Mc Ardle et al., 1994; Bergman, 1989; Astrand e Rodahl, 1986).

A junção neuromuscular é uma região especializada entre a porção final de um axônio de neurônio e a placa motora na fibra muscular, sendo então constituída por um terminal pré-sináptico dotado de vesículas sinápticas contendo neurotransmissor acetilcolina (ACh), membrana pré-sináptica, fenda sináptica e membrana pós-sináptica (Machado, 2007; Garner et al., 2000; Mc Ardle et al., 1994; Bergman, 1989; Astrand e Rodahl, 1986).

A região da membrana pré-sináptica, na qual as vesículas sinápticas se ancoram, funde-se à membrana das vesículas e os neurotransmissores são liberados na fenda sináptica, preenchida por uma substância amorfa, rica em fibras colágenas, proteoglicanos e enzimas; esta é a chamada zona ativa. A membrana pós-sináptica, justaposta à zona ativa, apresenta receptores para estes neurotransmissores e canais iônicos e é referida como densidade pós-sináptica (Garner et al., 2000) (Figura 4).

O mecanismo de excitação é controlado eletricamente pelo potencial de ação. A despolarização do músculo é comandada por nervos motores que se ramificam no tecido conjuntivo do perimísio. Quando este chega ao terminal pré-sináptico, a ACh é liberada na forma de quanta. Externamente à membrana do terminal, tem-se a enzima acetilcolinesterase capaz de hidrolizar a ACh em colina e ácido acético (Garner et al, 2000).

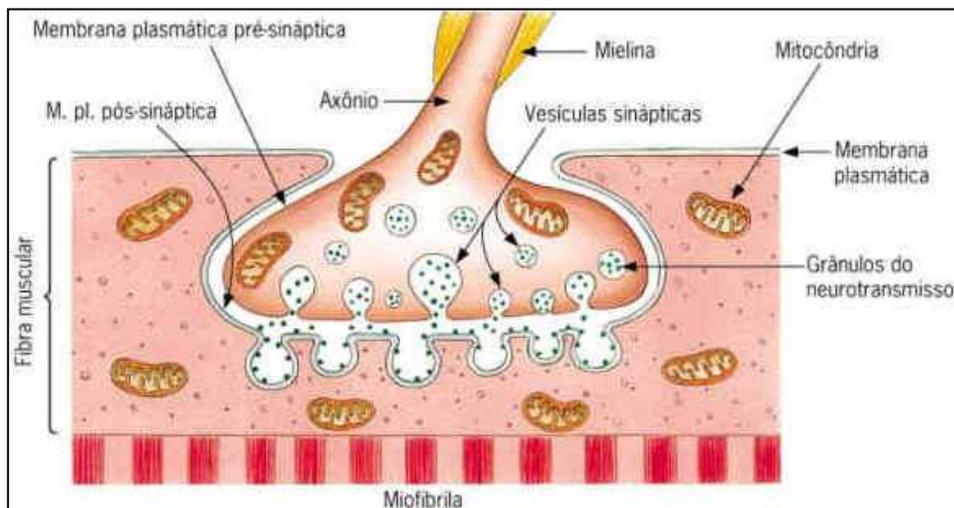


Figura 4: Esquema ilustrativo de uma junção neuromuscular indicando a área de sinapse. (Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-sistema-nervoso/imagens/sinaps16.jpg>)

A exocitose destas vesículas sinápticas ocorre na zona ativa e a subsequente recuperação endocítica dos componentes vesiculares pode ocorrer tanto na zona ativa quanto na área da zona pré-ativa, garantindo a liberação exocitótica de neurotransmissores próxima a seus receptores pós-sinápticos (Murthy e Camilli, 2003).

Vesículas sinápticas são estruturas membranosas com aproximadamente 40nm, apresentando grande quantidade de proteínas essenciais ao processo de exocitose de seu conteúdo (Takamori et al., 2006).

A sinaptofisina é a mais abundante glicoproteína de membrana encontrada na vesícula sináptica. Apresenta 4 domínios transmembrana e sua presença está diretamente relacionada à integridade das vesículas sinápticas, sendo sua ausência um indício da exocitose de ACh (Simpson et al., 1993).

As proteínas SNARE, como sinaptobrevina (VAMP), sintaxina1 e proteína sinaptossomal associada com 25 KDa (SNAP25), são conhecidas pela função relevante na exocitose. A sinaptobrevina está presente na membrana das vesículas, sendo designada como v-SNARE (*vesicle* SNARE). SNAP25 e sintaxina estão presentes na membrana pré-sináptica e são designadas t-SNAREs (*target* SNAREs) (Dumitru e Amato, 2008). Representação esquemática do complexo SNARE (Figura 5).

A (VAMPs), também constituinte da vesícula sináptica, é uma proteína integral de membrana com a extremidade N-terminal voltada para a região citoplasmática e com a extremidade C-terminal inserida no domínio transmembrana (Ceccarelli et al., 1973).

A sintaxina1, também conhecida como p35, é uma pequena proteína integral de membrana abundantemente expressa em neurônios. É um componente essencial para a fusão da vesícula sináptica e interage com outras importantes proteínas, incluindo sinaptobrevina, SNAP25, α -SNAP e sinaptotagmina1 (Dumitru e Amato, 2008). Já a SNAP25 (*synaptosome associated protein* - 25 kDa) é uma proteína de membrana ancorada à membrana pré-sináptica na face citoplasmática (Dumitru e Amato, 2008).

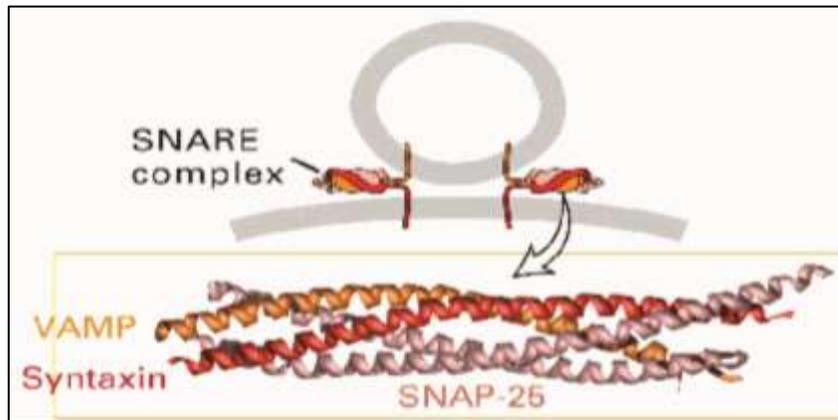


Figura 5: Representação esquemática do complexo SNARE: sinaptobrevina (VAMP), sintaxina (syntaxin) e SNAP25. (Fonte: trafegandointracel.blogspot.com 1186x1286)

3. Objetivos

O presente estudo pretendeu avaliar, em modelo de EM (EAE) induzido em camundongos:

- a morfologia da Musculatura Estriada Esquelética (MEE) e dos nervos do Sistema Nervoso Periférico (SNP) associados, utilizando a coloração Hematoxilina-Eosina (HE);
- a presença de fibrose nos tecidos conjuntivos associados à MEE e nervos do SNP, utilizando a coloração Tricômico de Masson (TM);
- a produção de $TNF\alpha$, uma citocina inflamatória, no MEE, por imunofluorescência;
- a expressão da proteína S100 nas Células de Schwann, por imunofluorescência;
- a expressão das proteínas da JNM (complexo SNARE – sinaptobrevina, SNAP25, sintaxina) e da vesícula sináptica (sinaptofisina), por imunofluorescência;
- a ação protetora do Sildenafil[®] no SNP.

4. Material e Métodos

4.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram adquiridos de diversos laboratórios, a saber:

- MOG₃₅₋₅₅(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, RheaBiotec, Brasil). A (MOG) 35-55 é um componente menor de mielina do SNC. É capaz de induzir uma doença neurológica remitente-recorrente com extensa desmielinização comum às manifestações da EM.
- Adjuvante de Freund completo (CFA, Sigma-Aldrich, EUA).
- Toxina *Pertussis* (Ptx, Sigma-Aldrich, EUA) produzida pela bactéria *Bordetella pertussis* que provoca a tosse convulsiva.
- α BgTx (Sigma-Aldrich, EUA) conjugada com FITC (F0195) e conjugada com TRITC (T9641).

Os anticorpos primários e secundários utilizados estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 1: Lista de anticorpos.

PRIMÁRIO	HOSPEDEIRO	LABORATÓRIO	CÓDIGO	DILUIÇÃO PRA IF
F4/80	Cabra	Santa Cruz	SC-26642	1:50
TNF α	Cabra	Santa Cruz	SC-1350	1:150
S100	Coelho	Santa Cruz	SC-7849	1:50
Sinaptofisina	Guinea Pig	SY-SY	101 004	1:100
Sinaptobrevina	Coelho	Sigma Aldrich	S5312	1:100
SNAP25	Camundongo	Sigma Aldrich	S9684	1:250
Sintaxina	Cabra	Sigma Aldrich	S06604	1:200
SECUNDÁRIO	HOSPEDEIRO	LABORATÓRIO	CÓDIGO	DILUIÇÃO PRA IF
Anti-Coelho IgG conjugado com FITC	Cabra	Sigma Aldrich	F0382	1:80
Anti-Camundongo IgG conjugado com FITC	Cabra	Sigma Aldrich	F0257	1:64
Anti-Cabra IgG conjugado com FITC	Camundongo	Sigma Aldrich	F7367	1:60
Anti-Guinea Pig conjugado com TRITC	Coelho	Sigma Aldrich	T7153	1:160

4.2. Animais

Foram utilizados 20 camundongos, fêmeas, da linhagem C57bl6, com 8 semanas. Os animais foram mantidos em biotério com água e alimento a vontade, em gaiolas, com temperatura e umidade controladas e ciclo de luz, e divididos em 4 grupos experimentais com 5 camundongos cada, a saber:

Grupo Naïve (N) - utilizado como grupo controle: neste grupo os animais não receberam qualquer tratamento;

Grupo Sildenafil (Sildenafil) - utilizado como grupo tratado;

Grupo EAE (Encefalomielite Autoimune Experimental) - neste grupo os animais foram imunizados com MOG 35-55e toxina Pertussis;

Grupo EAESC (EAESC) - neste grupo os animais foram imunizados e, posteriormente, tratados com Sildenafil®;

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas já estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), em concordância com as regras do Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Osvaldo Cruz (CEUA-CPqAM) (10/2010). As amostras obtidas foram apenas processadas e analisadas no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da USF.

4.3. Protocolo de indução da EM

Os animais (n=10), sendo que (5) para o grupo EAE, e outros (5) para o grupo EAESC, foram imunizados com MOG 35-55 (2mg/mL e PBS 0,02M) por injeção subcutânea de 50µL na pata traseira (no primeiro dia de tratamento) e com a toxina Pertussis (200ng/mL em PBS 0,02M - 2µL de toxina em 200µL de PBS), por injeção intraperitoneal, no primeiro dia e 48 horas após a imunização MOG, de acordo com Farias e colaboradores (2011), constituindo o grupo EAE (n=5).

De acordo com a literatura, o score clínico é classificado como: 0, sem sintomas; 1, cauda flácida; 2, cauda flácida e incapacidade de endireitar-se quando colocado de costas; 3, paralisia parcial dos membros posteriores; 4, paralisia completa dos membros posteriores; 5, paralisia completa dos membros posteriores e anteriores ou moribundas (Lewis et al., 2014).

Após classificados de acordo com os sinais clínicos acima descritos (Lewis et al., 2014) e diagnosticados como portadores de EM (Raposo et al, dados não publicados – gráfico), os animais foram sacrificados e as amostras processadas.

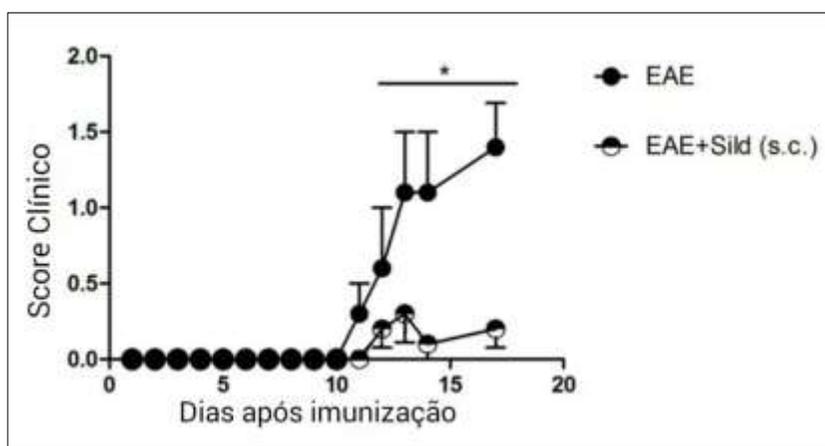


Figura 6: Gráfico com os dados do score clínico dos animais submetidos à imunização por MOG35-55; tratados ou não com Sildenafil®.

4.4. Protocolo de tratamento com Sildenafil®

Após a indução da EM parte dos animais (n=5) foi tratada com 0,2mL de Sildenafil® (25mg/kg em 2mL de salina 0,9%) via injeção subcutânea na região abdominal (uma aplicação a cada 8h por 15 dias após a imunização) (grupo EAESC). Outra parte dos animais (n=5), sem indução da EM, foi tratada apenas com Sildenafil®, constituindo o grupo Sildenafil. Os animais que não receberam qualquer intervenção constituíram o grupo naïve (n=5).

4.5. Histopatologia

Após o período de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia inalatória com isoflurano e os músculos gastrocnêmios dissecados, sendo os músculos das patas direitas destinados à criomicrotomia. Os músculos foram montados sobre papel filtro com auxílio de meio de montagem específico “OCT-TissueTek” e congelados em n-hexano resfriado em nitrogênio líquido. Os criocortes (10µm) foram submetidos às colorações e reações.

4.5.1. Histoquímica - Hematoxilina-Eosina (HE)

Os criocortes foram coletados em lâminas silanizadas, hidratados em água destilada por 5 minutos, imersos em Hematoxilina por 5 minutos, lavados em água destilada e então corados com Eosina, por 3 minutos. As lâminas foram novamente lavadas e desidratadas em série crescente de etanol: etanol 70% por um minuto, etanol 80% por um minuto, etanol 95% por um minuto, etanol I a 100% por cinco minutos, etanol II a 100% por cinco minutos, xilol I por 5 minutos e xilol II, por 5 minutos. Após o procedimento de desidratação, as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá para análise ao microscópio óptico.

4.5.2. Histoquímica - Tricrômico de Masson (TM)

Os criocortes coletados em lâminas silanizadas, foram hidratados por 5 minutos e mantidos *overnight* à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, coradas em solução de Hematoxilina Férrica de Weigert, por 10 minutos, lavadas novamente em água corrente, por 10 minutos, e em água destilada para posteriormente serem coradas em solução de Escarlata de Biebrich, por 5 minutos. Após as primeiras colorações, as lâminas foram rapidamente lavadas em água destilada e diferenciadas em solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico, durante 10 a 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada, coradas em solução de Azul de Anilina, durante 10 minutos, novamente lavadas em água destilada e banhadas em solução de Ácido Acético Glacial 1%, por 5 minutos. As lâminas foram finalmente

lavadas em água destilada, desidratadas, em série crescente de etanol, diafanizadas, em xilol, e montadas com Bálsamo do Canadá para análise ao microscópio ótico.

4.5.3. Imunofluorescência (IF)

Cortes histológicos foram obtidos em criostato e coletados em lâminas silanizadas. O material foi permeabilizado em etanol e metanol resfriado (-20°C) por 10 minutos cada, pré-incubado em Triton X-100 (0,1%), por 15 minutos em temperatura ambiente, lavado em PBS 0,05M (2 banhos de 5 minutos cada) para incubação “overnight” em anticorpo primário, em geladeira. Passado o período de incubação, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 1h, lavadas PBS 0,05M (2 banhos de 15 minutos cada) e submetidas a um período de incubação de 2h em anticorpo secundário, à temperatura ambiente, em câmara escura.

Em seguida os criocortes foram novamente lavados em PBS 0,05M (2 banhos de 15 minutos cada). As lâminas foram secas e montadas em gelatina glicerinada para serem analisadas ao microscópio de fluorescência (Olympus BX51).

5. Resultados

A coloração HE foi utilizada para caracterizar a musculatura estriada esquelética, especificamente o músculo gastrocnêmio dos camundongos dos grupos naïve, Sildenafil, EAE, EAESC.

Tal análise mostrou fibras musculares preservadas, com sarcolema íntegro, disposição homogênea dos miofilamentos no sarcoplasma e núcleos periféricos. Entretanto, um discreto edema tecidual foi observado na região de perimísio (Figura 7) nos grupos Sildenafil, EAE e EAESC, sem a presença de infiltrado inflamatório.

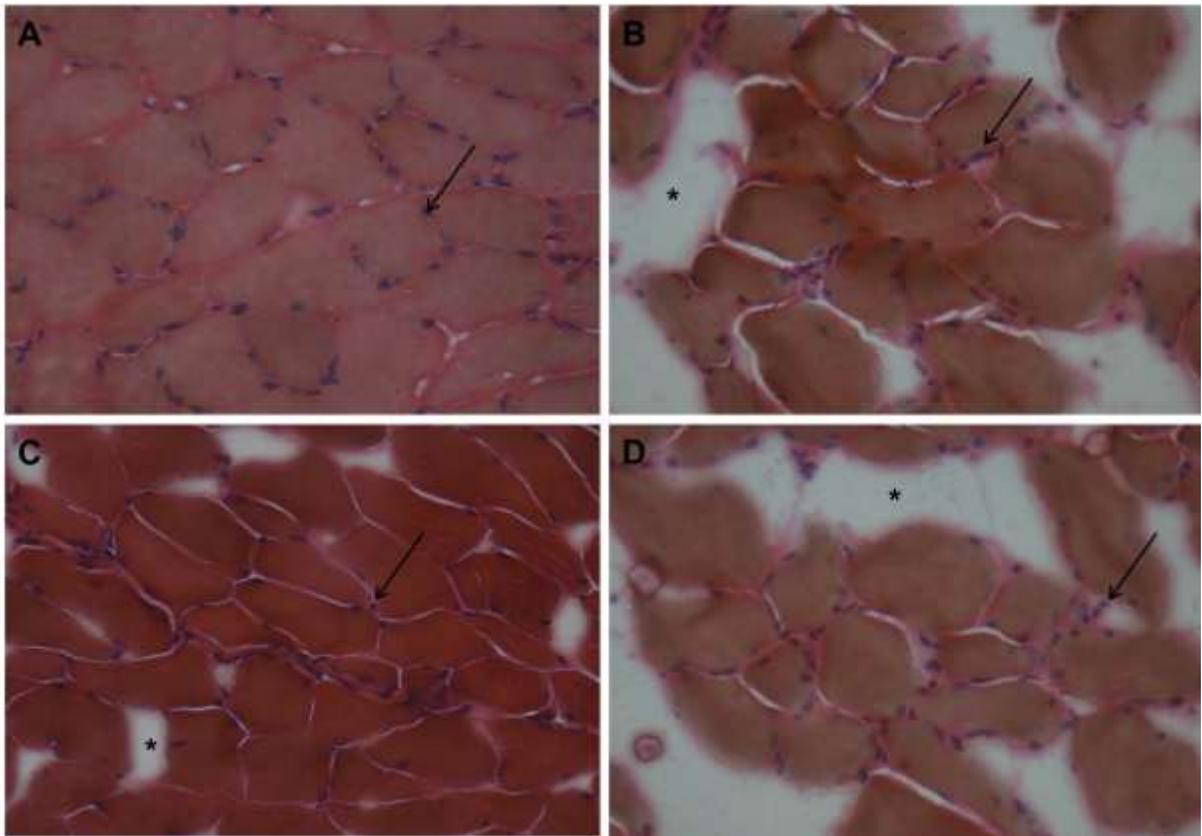


Figura 7: Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à técnica Hematoxilina-Eosina, para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Fibras musculares com morfologia preservada (formato hexagonal), miofilamentos dispostos de forma homogênea por todo o sarcoplasma, núcleos periféricos (seta). Observar edema tecidual na região de perimísio (*) nos grupos Sildenafil, EAE e EAESC (B-D), sem infiltrado inflamatório. Aumento: 400x.

A coloração de Tricrômico de Masson foi utilizada para averiguar a distribuição de tecido conjuntivo no endomísio, perimísio e epimísio, e um possível processo de fibrose. Tal processo não foi observado em nenhum dos grupos experimentais (Figura 8).

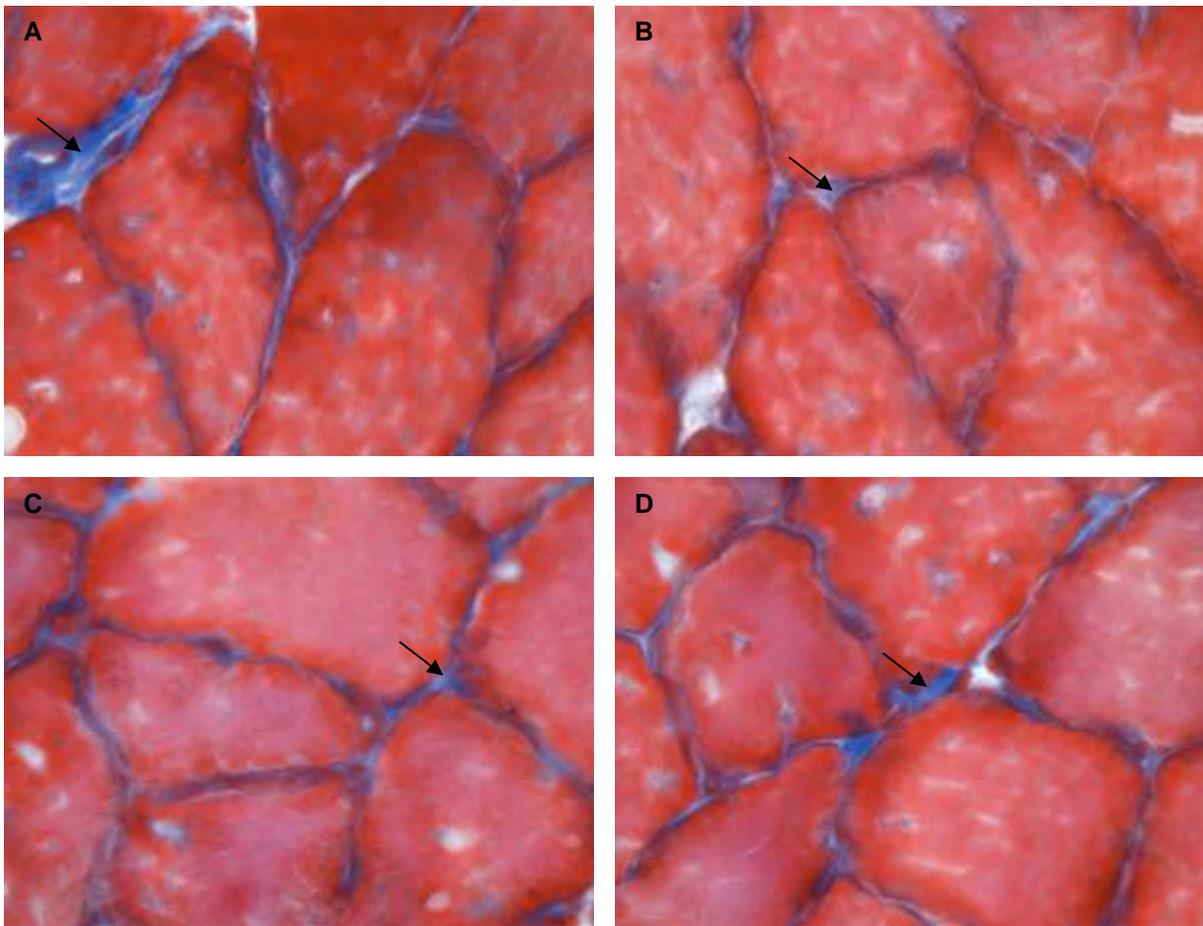


Figura 8: Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à técnica Tricrômico de Masson, para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Fibras musculares com morfologia preservada (formato hexagonal), miofilamentos dispostos de forma homogênea por todo o sarcoplasma, núcleos periféricos (seta). Não foi observado fibrose, e infiltrado inflamatório em nenhum dos grupos experimentais. Aumento: 400x.

Para análise da expressão da citocina TNF α e para detecção de macrófagos, a partir da expressão de F4/80, realizou-se imunofluorescência (IF) com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo FITC (verde).

Não houve imunomarcção de TNF α para as fibras musculares em nenhum dos grupos estudados. Porém, observou-se expressão desta citocina nos grupos Sildenafil, EAE e EAESC nas células do tecido conjuntivo adjacente (endomísio e perimísio) (Figura 9).

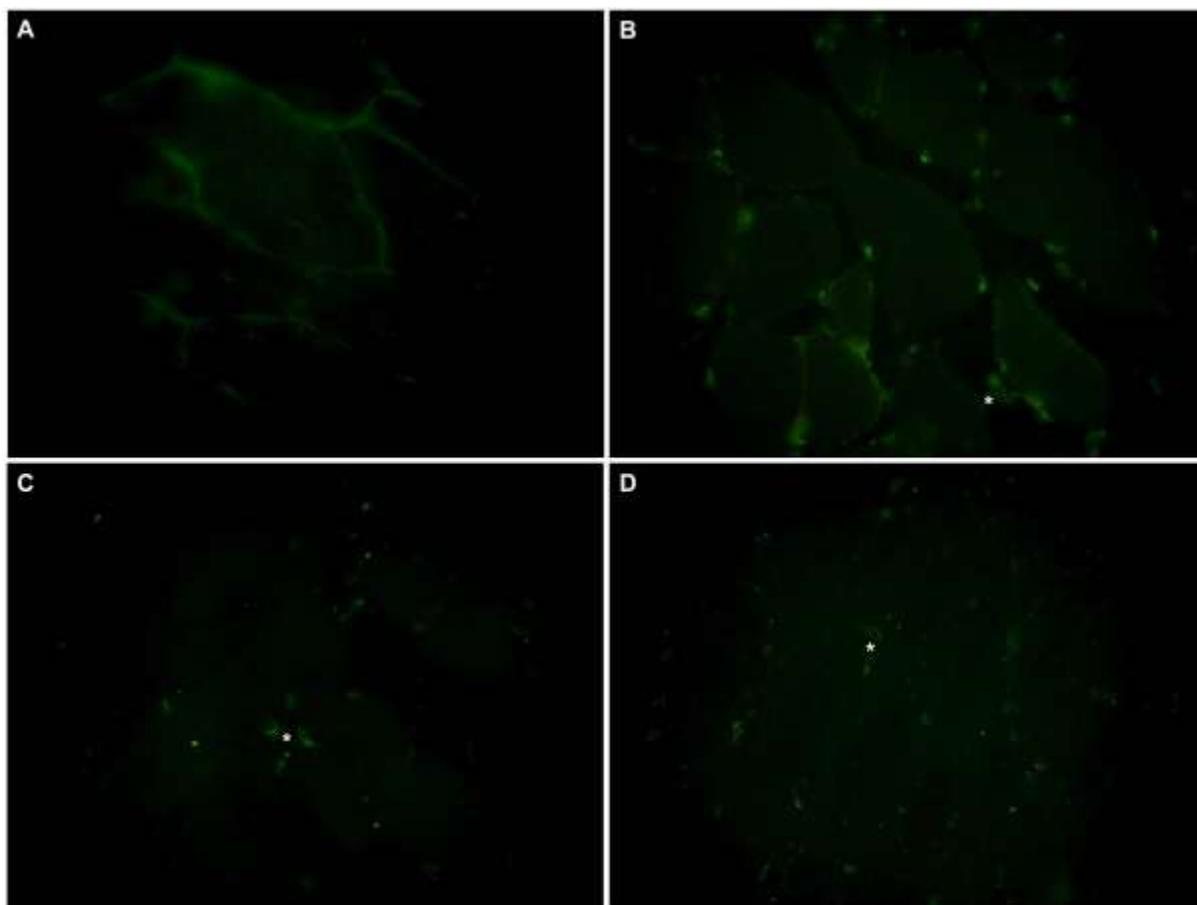


Figura 9: Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da citocina TNF α , para os grupos: naíve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Observar imunomarcção positiva nos grupos Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D) na região de endomísio e perimísio, evidenciando a expressão desta citocina pelas células residentes do tecido conjuntivo (*). Não há expressão de TNF α pelas fibras musculares em nenhum dos grupos experimentais. Aumento: 400x.

Já a imunofluorescência para a marcação da proteína F4/80 foi observada apenas nos grupos EAE e EAESC, evidenciando a presença de macrófagos no tecido conjuntivo (Figura 10).

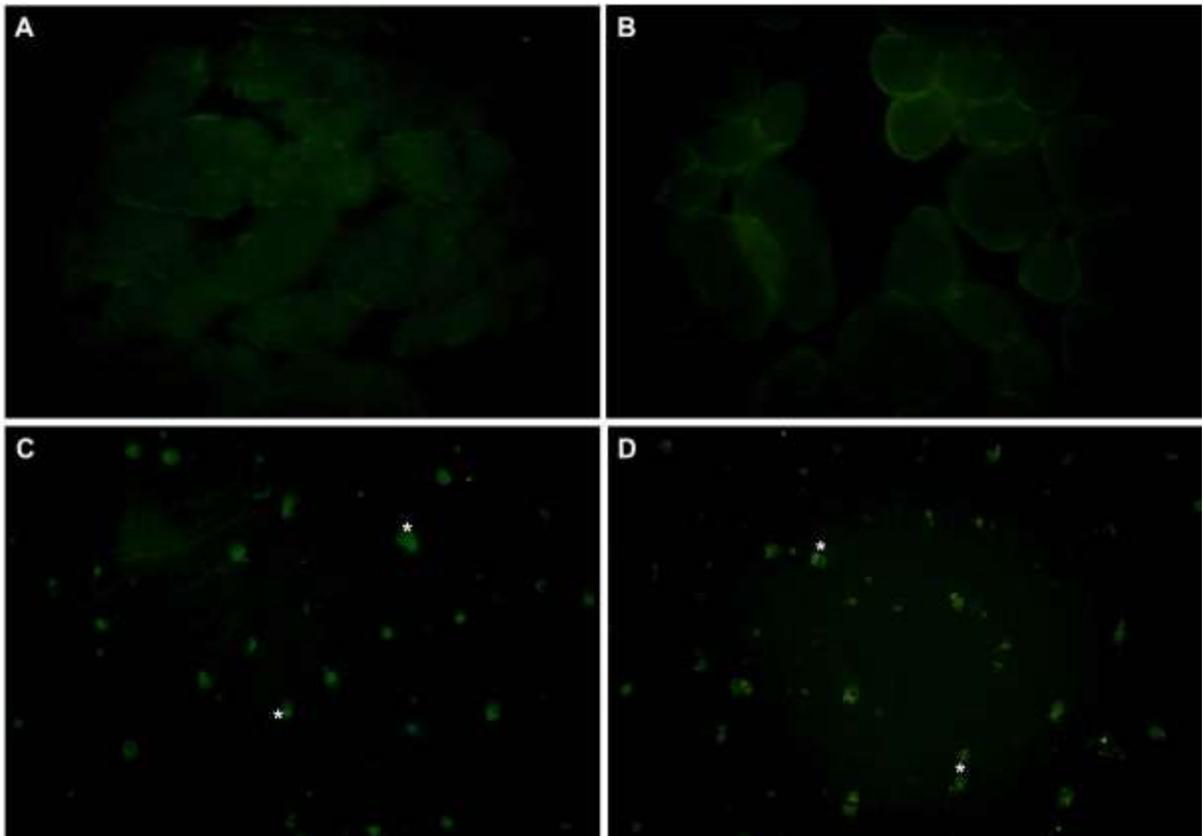


Figura 10: Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína F4/80, para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Observar imunomarcação positiva nos grupos EAE (C) e EAESC (D), evidenciando a presença de macrófagos (*) no tecido conjuntivo. Aumento: 400x.

A caracterização morfológica dos nervos do SNP foi possível a partir da técnica de IF para marcação da proteína S100, a qual está localizada no núcleo e no citoplasma das Células de Schwann. Desta forma a imunomarcação positiva revela a presença e integridade da bainha e mielina.

Nervos em corte transversal foram observados nos quatro grupos experimentais estudados, entretanto a reação foi fortemente positiva apenas para os grupos naïve e Sildenafil (Figura 11A-B), quando comparada aos grupos EAE e EAESC (Figura 11C-D), nos quais a marcação foi fracamente positiva, indicando possíveis alterações nas Células de Schwann.

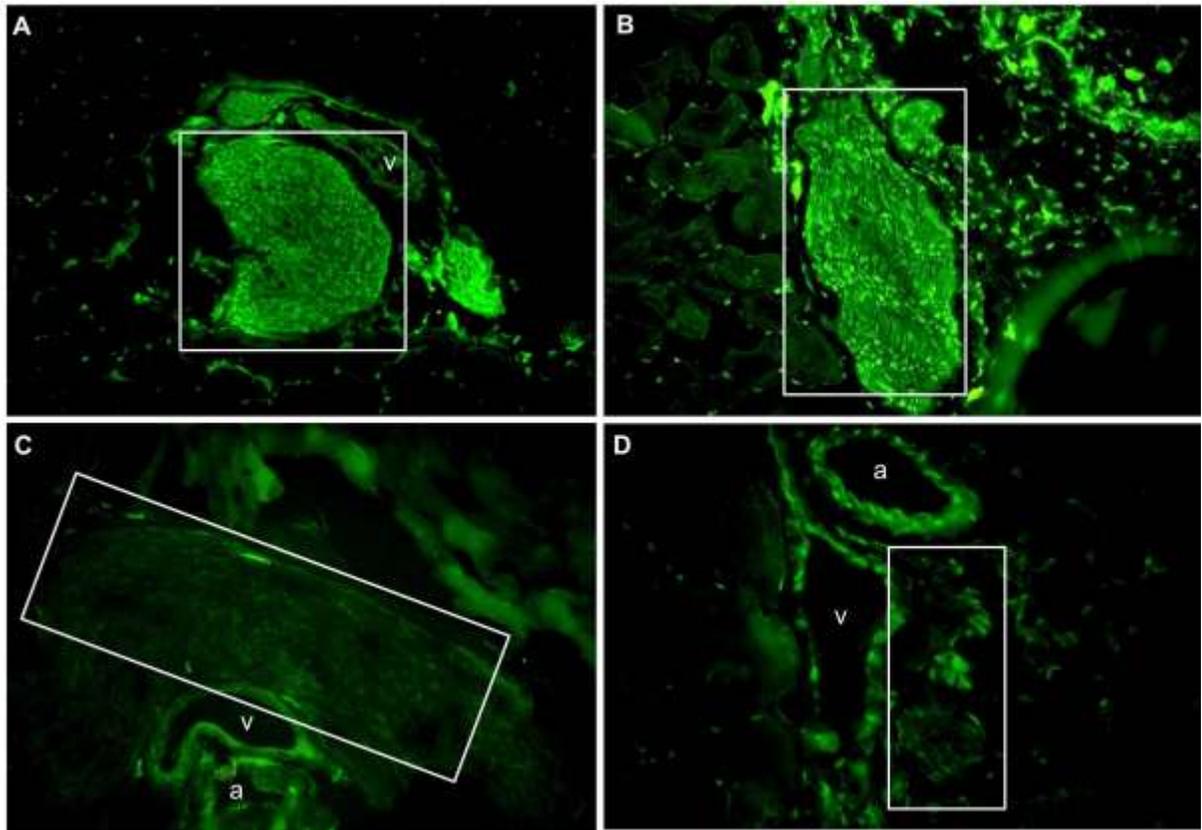


Figura 11: Cortes histológicos de nervos (quadros) associados aos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína S100, para os grupos: naïve (A), Sildenafil (B), EAE (C) e EAESC (D). Observar imunomarcação fortemente positiva nos grupos naïve (A) e Sildenafil (B). Não há marcação para o grupo EAE (C), porém a marcação é fracamente observada no grupo EAESC (D), evidenciando possíveis alterações nas Células de Schwann. a – arteríola; v – vênula. Aumento: 100x.

O estudo microscópico da junção neuromuscular foi realizado a partir da marcação das proteínas presentes nas vesículas sinápticas (sinaptofisina e sinaptobrevina), na membrana pré-sináptica (SNAP25 e syntaxina). A alfa bungarotoxina (α BgTx), uma proteína isolada do veneno da serpente *Bungarus multicinctus*, conjugada a fluorocromo (FITC ou TRITC), atua bloqueando os receptores nicotínicos da ACh na membrana pós-sináptica, sendo utilizada como marcador da integridade da mesma.

Em todos os grupos experimentais (naïve, Sildenafil, EAE e EAESC) observou-se marcação positiva para α BgTx, indicando que não há alterações morfológicas ou moleculares na membrana pós-sináptica (Figuras 12 a 15).

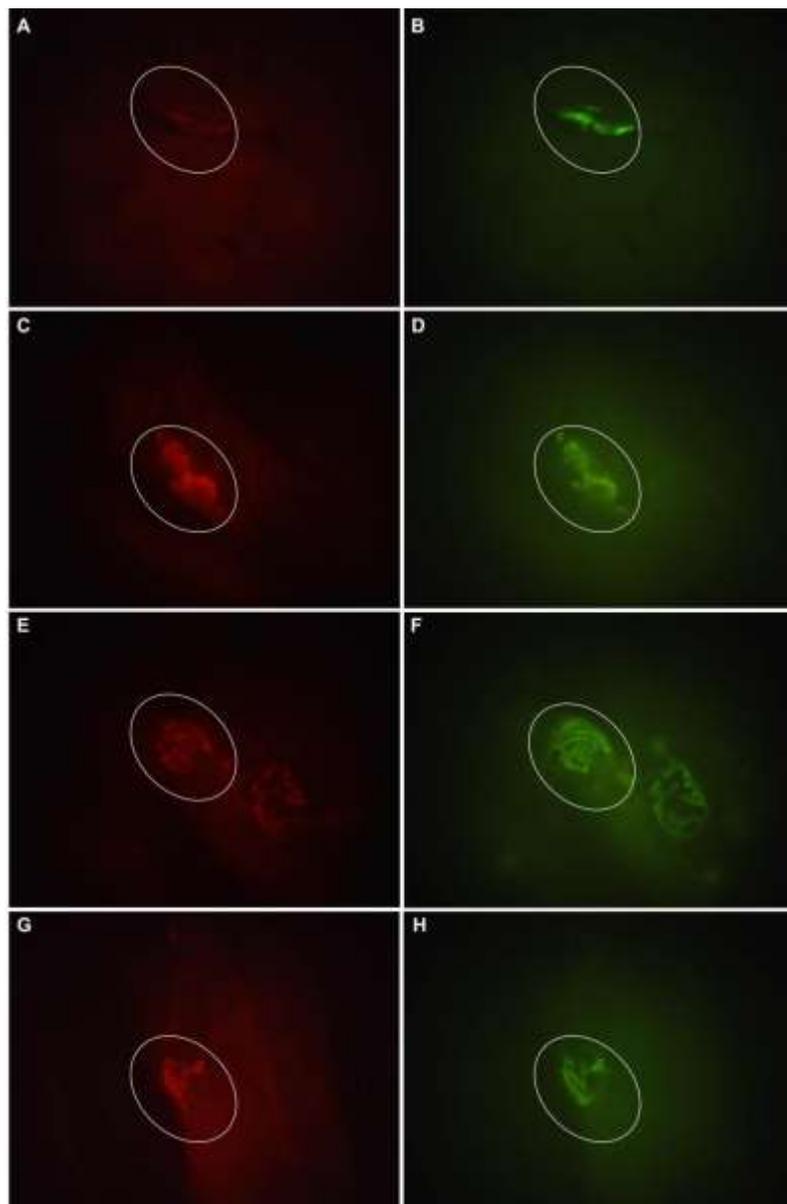


Figura 12: Cortes histológicas de músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína sinaptofisina (A, C, E, G) e α BgTx (B, D, F, H) para os grupos naïve (A, B), Sildenafil (C, D), EAE (E, F) e EAESC (G, H). Notar a presença dos receptores para acetilcolina preservados na membrana pós-sináptica (sarcolema) da junção neuromuscular (FITC). Observar imunomarcção positiva da sinaptofisina para todos os grupos. Aumento: 400x.

A imunomarcção para as proteínas sinaptofisina (Figura 12) e sinaptobrevina (Figura 13) foi observada em todos os grupos, indicando a presença de vesículas sinápticas intactas e parte do complexo v-SNARE está preservado.

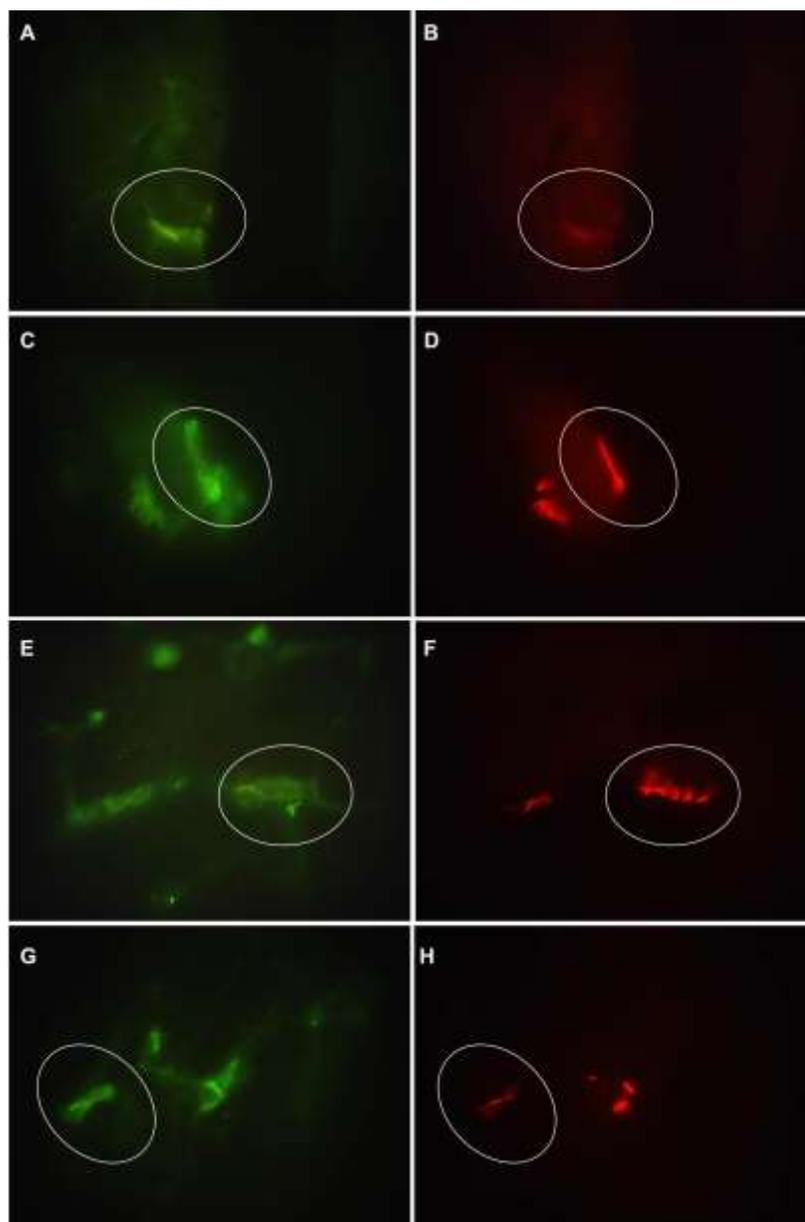


Figura 13: Cortes histológicos dos músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína sinaptobrevina (A, C, E, G) e a α BgTx (B,D,F,H) para os grupos naïve (A, B), Sildenafil (C, D), EAE (E, F) e EAESC (G, H). Notar a presença dos receptores para acetilcolina preservados na membrana pós-sináptica (sarcolema) da junção neuromuscular (TRITC). Observar imunomarcção positiva da sinaptobrevina para todos os grupos. Aumento: 400x.

Considerando as proteínas do complexo t-SNARE, a marcação para a SNAP25 foi fortemente positiva para o grupo naïve, moderadamente positiva para o grupo Sildenafil e fracamente positiva para os grupos EAE e EAESC, o que infere diminuição da expressão da mesma (Figura 14).

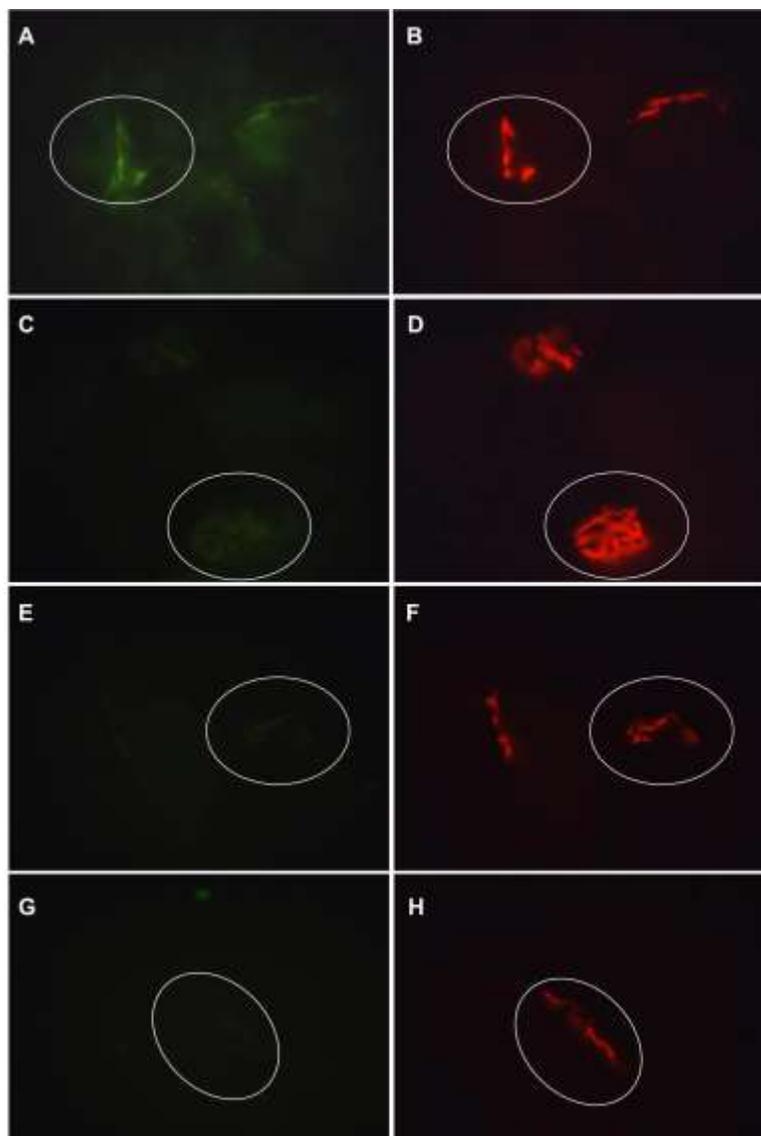


Figura 14: Cortes histológicos de músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína SNAP25 (A, C, E, G) e α BgTx (B, D, F, H) para os grupos naïve (A, B), Sildenafil (C, D), EAE (E, F) e EAESC (G, H). Notar a presença dos receptores para acetilcolina preservados na membrana pós-sináptica (sarcolema) da junção neuromuscular (TRITC). Observar imunomarcagem da SNAP25 fortemente positiva no grupo naïve (A), moderadamente positiva no grupo Sildenafil (C) e fracamente positiva para os grupos EAE (E) e EAESC (G). Aumento: 400x.

Já a imunomarcção da proteína syntaxina foi positiva para todos os grupos experimentais (naïve, Sildenafil, EAE e EAESC) (Figura 15).

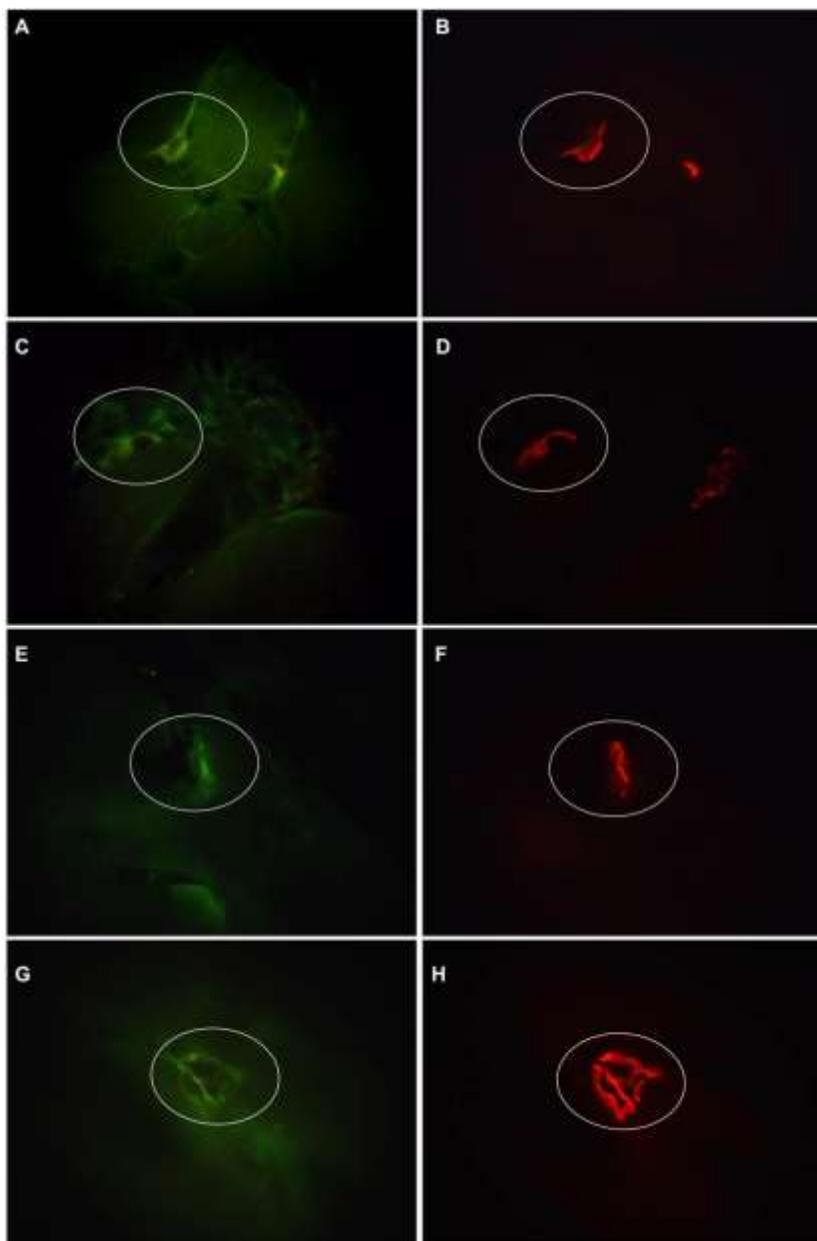


Figura 15: Cortes histológicas de músculos gastrocnêmios de camundongos, submetidos à imunofluorescência para marcação da proteína syntaxina (A, C, E, G) e α BgTx (B, D, F, H) para os grupos naïve (A, B), Sildenafil (C, D), EAE (E, F) e EAESC (G, H). Notar a presença dos receptores para acetilcolina preservados na membrana pós-sináptica (sarcolema) da junção neuromuscular (TRITC). Observar imunomarcção da syntaxina positiva para todos os grupos. Aumento: 400x.

Tabela 2: Sumário de Resultados.

	Naïve	Sildenafil	EAE	EAESC
HE	Morfologia preservada Ausência de infiltrado inflamatório (-) Ausência de edema (-)	Morfologia preservada Ausência de infiltrado inflamatório (-) Presença de edema (+)	Morfologia preservada Ausência de infiltrado inflamatório (-) Presença de edema (+)	Morfologia preservada Ausência de infiltrado inflamatório (-) Presença de edema (+)
TM	Ausência de fibrose (-)	Ausência de fibrose (-)	Ausência de fibrose (-)	Ausência de fibrose (-)
TNFα	Imunomarcacão negativa (-) no tecido muscular Imunomarcacão negativa (-) no tecido conjuntivo	Imunomarcacão negativa (-) no tecido muscular Imunomarcacão positiva (++) no tecido conjuntivo	Imunomarcacão negativa (-) no tecido muscular Imunomarcacão positiva (++) no tecido conjuntivo	Imunomarcacão negativa (-) no tecido muscular Imunomarcacão positiva (++) no tecido conjuntivo
F4/80	Imunomarcacão negativa (-) no tecido conjuntivo	Imunomarcacão negativa (-) no tecido conjuntivo	Imunomarcacão positiva (++) no tecido conjuntivo	Imunomarcacão positiva (++) no tecido conjuntivo
S100	Imunomarcacão fortemente positiva (+++) na bainha de mielina	Imunomarcacão fortemente positiva (+++) na bainha de mielina	Imunomarcacão negativa (-) na bainha de mielina	Imunomarcacão fracamente positiva (+) na bainha de mielina
Sinaptofisina	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)
Sinaptobrevina	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)
SNAP25	Imunomarcacão fortemente positiva (+++)	Imunomarcacão moderadamente positiva (+/-).	Imunomarcacão fracamente positiva (+)	Imunomarcacão fracamente positiva (+)
Sintaxina	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)	Imunomarcacão positiva (++)
αBgTx	Imunomarcacão positiva (++) na membrana pós-sináptica	Imunomarcacão positiva (++) na membrana pós-sináptica	Imunomarcacão positiva (++) na membrana pós-sináptica	Imunomarcacão positiva (++) na membrana pós-sináptica

Legenda: Fortemente positivo +++; Positivo ++; Fracamente positivo +; Moderadamente positivo +/-; Negativo -; Presença +; Ausência -.

6. Discussão

De causa ainda indefinida, a causa da EM tem sido atribuída a alguns vírus e bactérias (Moreira et al., 2002), a fatores ambientais, socioculturais, nutricionais ou até mesmo a traumas físicos (Young, 2011; Jelinek e Hased, 2007). Tais aspectos justificam a maior incidência de casos nos países da Europa e América do Norte (Ferreira et al., 2004), mas não explicam por que a doença acomete adultos jovens entre 20 e 40 anos, predominantemente do sexo feminino (Fox et al., 2006).

Conforme os primeiros relatos de casos (Medaer, 1979), necropsias (Cruveilhier, 1891; Carswell, 1838), e estudos descritos na literatura, a EM é uma doença caracterizada pela perda da bainha de mielina nos neurônios do SNC, sem prejuízo à mielinização do SNP (Fisher et al., 1983; Ro et al., 1983; Schoene et al., 1977).

O modelo EAE tem sido muito estudado para o entendimento da EM, uma vez que apresenta um quadro de desmielinização associado a um processo inflamatório, com ativação de linfócitos T no SNC (Fletcher et al., 2010; Bernard, 1975). Estes estudos têm mostrado que a degeneração da camada lipídica que envolve os axônios é decorrência da ação do sistema imune, que produz anticorpos contra os oligodendrócitos - células gliais responsáveis pela produção da bainha de mielina no SNC (Contran et al., 2000; Compston, 1999). Tal desmielinização leva à degeneração dos neurônios e, conseqüentemente, à perda de sua função (Junqueira e Carneiro, 2013; Guyton e Hall, 2011), resultando nos sinais e sintomas descritos na EM.

A análise histopatológica das regiões afetadas do SNC mostra, além da desmielinização, proliferação astrocítica e gliose (Kumar et al., 2011), lesão axonal com infiltrado inflamatório perivascular de linfócitos e monócitos, por ruptura da Barreira Hematoencefálica (BHE). Há aumento dos níveis de citocinas, mesmo quando o processo inflamatório está ausente, no plasma e no LCE (Goldman e Ausiello, 2005).

Segundo a literatura atual, os nervos periféricos não são afetados, provavelmente porque a reação imunitária que danifica os oligodendrócitos seja específica, não afetando as Células de Schwann que são responsáveis pela mielinização no SNP (Junqueira e Carneiro, 2013; Guyton e Hall, 2011) Tilbery e

colaboradores (2000) observaram, em pacientes, ramos terminais do nervo motor com poucos núcleos de Células de Schwann e degeneração axoplasmática em áreas de atrofia muscular.

O presente estudo evidenciou alterações no SNP, indicativas de uma possível diminuição de mielinização dos nervos associados ao músculo gastrocnêmio. Quando analisada a expressão da proteína S100, específica de Células de Schwann, observou-se fraca fluorescência nos nervos dos animais dos grupos EAE e EAESC, sugerindo que houve alteração na produção desta proteína por estas células e, conseqüentemente, alteração na mielinização destes neurônios. Tal observação indica dano não só aos oligodendrócitos, mas também às Células de Schwann sugerindo que, de alguma forma, a reação imunitária não é restrita aos oligodendrócitos.

Além disso, observou-se, nos grupos EAE e EAESC, além de edema tecidual muscular e presença de macrófagos via expressão de F4/80, reforçando um processo inflamatório em curso.

Sabe-se que pode haver comprometimento da MEE de pacientes portadores de EM (aproximadamente 30% dos casos), sem diferenças entre as formas clássica e progressiva. Entre as principais alterações histológicas estão a vasculite do tipo linfoplasmocitária, o aumento da porcentagem de fibras musculares de contração rápida - tipo IIB e o acúmulo de lipídio intrasarcoplasmático (Tilbery et al, 1989).

Tais alterações podem estar relacionadas às, relatadas ou observadas, manifestações clínicas, como fraqueza (Charcot, 1968), paralisia espástica, tremor intencional e dificuldades na fala (Autregésilo e Costa Rodrigues, 1926), além do acometimento de outros MEEs, como o músculo diafragma (Cooper et al., 1988).

Diferentemente do relatado por Tilbery e colaboradores (1989), em modelo animal de EAE, os músculos gastrocnêmios dos camundongos não apresentaram alterações morfológicas visíveis através das técnicas utilizadas no presente estudo, bem como os animais dos grupos naïve, Sildenafil e EAESC. Também não houve proliferação de tecido conjuntivo – fibrose, nos músculos gastrocnêmios ou nervos associados dos animais, em todos os grupos experimentais, como observado em biópsias da medula espinal, ponte e bulbo de pacientes portadores de EM.

Entretanto, à imunofluorescência observou-se a expressão da citocina pró-inflamatória TNF α na região de perimísio, como também reportado para o SNC (Goldman e Ausiello, 2005). A liberação desta, e de outras quimiocinas, linfocinas e monocinas, pode ser observada mesmo na ausência de um infiltrado inflamatório linfocitário (Goldman e Ausiello, 2005), como observado no presente estudo.

A presença do infiltrado de macrófagos corrobora com a hipótese etiopatogênica de um mecanismo autoimune na EM, no qual há infiltração perivascular de linfócitos e monócitos através da ruptura da BHE (Goldman e Ausiello, 2005).

A atrofia muscular relatada em humanos parece não ser a única responsável pela perda de massa muscular, mas sim a perda de mielinização dos nervos periféricos (Tilbery et al., 1989), como sugerido no presente trabalho.

Tendo sido considerada em 1935 como uma doença autoimune, a terapêutica da EM tem se baseado desde então no uso de drogas imunossupressoras que modulam a resposta imune, reduzindo os surtos (Moreira, 2002a) e o surgimento de novas lesões (Pedrosa et al., 2010), com efeitos colaterais transitórios e passageiros (Tilbery et al., 2000). Em contrapartida às drogas tradicionais, novos medicamentos têm sido considerados, como o Natalizumab[®] que bloqueia a diapedese das células inflamatórias através da BHE para o tecido neural (Mellergard et al., 2010; Pedrosa et al., 2010).

Dados experimentais têm mostrado que o processo autoimune se dá contra os antígenos da bainha de mielina (Kumar et al., 2005), o que tem direcionado o tratamento da EM ao uso de drogas que modifiquem esse processo inflamatório (Callegaro, 2002). Estudos *in vitro* e *in vivo*, em modelo de desmielinização por cuprizona (Nunes et al., 2012), mostraram que o Sildenafil[®] atua como modulador da neuroinflamação, aumentando a perfusão (Manson, 2005) e induzindo a neurogênese (Zhang, 2006; Manson, 2005), diminuindo a microgliose, a astrogliose e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IFN γ , IL1 β , IL-12, de COX-2 e GFAP, protegendo a bainha de mielina (Nunes et al., 2012). O Sildenafil[®] também reduziu a expressão de citocinas IL-1 β e IFN γ em animais *knockout* para iNOS, melhorando a mielinização com uma possível ação anti-inflamatória para o fármaco (Raposo et al., 2013).

Em lesões experimentais de nervos, o Sildenafil® foi capaz de alterar os níveis de neurotransmissores, além de fatores neurotróficos e de citocinas, favorecendo a regeneração nervosa no SNP (Hlaing et al., 2013).

Os neurotransmissores sintetizados no corpo celular dos neurônios, como a ACh, são armazenados em vesículas sinápticas as quais apresentam proteínas importantes para sua estrutura (sinaptofisina) e ancoragem (sinaptobrevina) à membrana pré-sináptica (SNAP25 e syntaxina). Sua liberação na fenda sináptica via exocitose permite sua ligação aos receptores nicotínicos presentes na membrana pós-sináptica, garantindo a contração muscular (Junqueira e Carneiro, 2013; Guyton e Hall, 2011; Takamori et al, 2006; Murth e De Camilli, 2003; Garner et al, 2000; Roos e Kelly, 1999).

No presente estudo, os músculos gastrocnêmios dos camundongos dos grupos naïve, Sildenafil, EAE e EAESC apresentaram-se íntegros, com sarcoplasma e sarcolema inalterados. Da mesma forma, quando observada por fluorescência a JNM também estava preservada com receptores funcionais, via marcação por α BgTx. Na porção pré-sináptica da JNM a sinaptofisina e as proteínas do complexo t- e v-SNARE apresentaram marcação positiva, evidenciando também que as vesículas sinápticas e que toda a maquinaria necessária para sua exocitose [sinaptofisina - vesícula sináptica (Takamori et al., 2006; Simpson et al., 1993); sinaptobrevina (VAMP), syntaxina1 e SNAP25 - membrana da vesícula sináptica, membrana pré-sináptica (Dumitru e Amato, 2008; Ceccarelli et al., 1973)] estavam integras. A proteína SNAP25 apresentou visível diminuição na fluorescência para os grupos EAE e EAESC. Neste caso, provavelmente, não houve alteração nos níveis de neurotransmissores.

Após a exocitose de seu conteúdo, as vesículas sinápticas sofrem endocitose através de invaginações de membrana e formação de cisternas ou ainda por endocitose designada como “Beije e Fuja”, na qual vesículas liberam seu conteúdo sem integrarem completamente à membrana pré-sináptica, sendo reacidificadas e novamente preenchidas por neurotransmissores (Richards et al., 2003; Takei et al., 1996).

Estudos eletromiográficos/eletrofisiológicos de pacientes portadores de EM demonstraram sinais de denervação que corroboram com os sinais e sintomas relatados

pelos mesmos (Tilbery, 2005; Petajan, 1982), entretanto não há dados sobre potenciais evocados ou conteúdo quântico da JNM ou outras informações que confirmem o observado nos animais em modelo de EAE.

Em experimentação com ratos, o Sildenafil[®] apresentou-se capaz de inibir mudanças nos níveis de neurotransmissores e citocinas mesmo após dano aos nervos (Hlaing et al., 2013).

Considerando as proteínas do complexo t-SNARE, a marcação para a SNAP25 foi fortemente positiva para o grupo naïve, moderadamente positiva para o grupo Sildenafil e fracamente positiva para os grupos EAE e EAESC, o que infere diminuição da expressão da mesma e possível prejuízo ao processo de ancoragem da vesícula sináptica.

Embora o Sildenafil[®], através da via do óxido nítrico, seja capaz de proteger desmielinização no SNC (NO) (Nunes et al., 2012; Gómez-Pinedo et al., 2010; Zhang et al., 2006), não apresentou a mesma função para o SNP.

7. Conclusão

O presente estudo constatou que a EM, sendo uma patologia própria do SNC:

1. Apresenta efeitos também no SNP, porém, sem que haja alteração morfológica na MEE;
2. Induz discreto edema tecidual, porém, sem infiltrado inflamatório leucocitário;
3. Não causa fibrose nos tecidos conjuntivos associados à MEE e nervos do SNP;
4. Não ocasiona produção de $TNF\alpha$, pelas MEE, apenas no tecido conjuntivo do perimísio;
5. Recruta macrófagos para o tecido conjuntivo do perimísio;
6. Ocasiona a diminuição da imunomarcação de S100, o que indica também uma diminuição na mielinização e/ou desmielinização e possíveis alterações na atividade das Células de Schwann;
7. Não altera a expressão das proteínas sinaptobrevina e syntaxina, presentes na JNM e da sinaptofisina, presente na vesícula sináptica;
8. Altera a expressão da proteína SNAP25, presente na JNM, indicando alteração em parte da “maquinaria da exocitose” e, possivelmente, déficit de liberação de ACh.

Já o Sildenafil®:

1. Por sua ação vasodilatadora, foi capaz de induzir a formação de edema;
2. Por sua ação anti-inflamatória, foi capaz de levar à expressão de $TNF\alpha$ e reduzir o recrutamento de macrófagos;
3. Por sua ação neuroprotetora, foi capaz de manter a expressão de S100, o que resulta na manutenção da mielinização dos nervos do SNP.

8. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, L. H. R. B. et al. Ensinando e aprendendo com portadores de esclerose múltipla: relato de experiência. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 60, n. 4, p. 460-463, 2007.

ASTRAND, P. O. ; RODAHL, K. **Tratado de fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 617 p. 1986.

AUSTREGÉSILO, A.; COSTA, J. F.; RODRIGUES, L. Caso de esclerose em placas com lesões de cordões posteriores. **Arquivos Brasileiros de Neuropsiquiatria**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 221-445, 1926.

BALLARD, S. A.; GIL GINGEL, C. P. C.; PRICE, M. E. Sildenafil, an inhibitor of Phosphodiesterase type 5, enhances nitric oxide mediated relaxation of human corpus cavernosum. **International Journal of Impotence Research**, London, v. 82, p. 103-88, 1996.

BERGMAN, R. A. **Atlas of microscopic anatomy: a functional approach: companion to histology and neuroanatomy**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 22 p. 1989.

BERNAR, C. C. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: genetic control of susceptibility. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 263-274, 1976.

BERNARD, C. C.; CARNEGIE, P. R. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 114, n. 5, p. 1537-1540, 1975.

BONDESON, J.; SUNDLER, R. Antimalarial drugs inhibit phospholipase A₂ activation and induction of interleukin Ibeta and tumor necrosis Factor alpha in macrophages implications for their mode of action in rheumatoid arthritis. **General Pharmacology**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 357-366, 1998.

Bradley, W.G. et al. Multiple sclerosis and other inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system, In: _____. **Neurology in clinical practice**. 5th ed. Philadelphia: Butterworth Heinemann, 2014. p. 1583-1613.

CALLEGARO, D. Esclerose múltipla. In: NITRINI, R.; BACHESCHI, L. A. **A neurologia que todo médico deve saber**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 335-340.

CALLEGARO, D.; GOLDBAUM, M.; MORAIS, L. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 104, n. 4, p. 208-213, 2001.

CALLEGARO, D.; MACHIORI, P. Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da Esclerose Múltipla: as evidências para o uso de imunossupressores, plasmaférese e transplante autólogo de células tronco. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.60, n. 3B, p. 4243-4973, 2011.

CARSWELL, R. **Pathological anatomy**: illustrations of the elementary forms of disease. 1st ed. London: Longman Orme, 33 p. 1838.

CECCARELLI, B.; HURLBUT, W. P.; MAURO, A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 57, n. 2, p. 499-524, 1973.

CELLA, M. et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. **Nature Medicine**, New York, v. 5, n. 8, p. 919-923, 1999.

CHARCOT, J. M. Histologie de la sclérose en plaques. **Gazette des Hospitiaux**, Paris, v. 41, p. 234-248, 1868.

CHARLES, P. et al. Estudo histoquímico do músculo estriado esquelético na esclerose múltipla. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.17, p. 315-331, 1989.

CHAVES, M. L. F.; FINKELSZTEJN, A.; STEFANI, M. A. **Rotinas em neurologia e neurocirurgia**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 61 p. 2008.

CHOFFLON, M. Mechanisms of action for treatments in multiple sclerosis. **BioDrugs**, Auckland, v. 19, n. 5, p. 299-308, 2005.

COLES, A. J.; COMPSTON, A. Multiple sclerosis. **Lancet**, London, v. 359, n. 9313, p. 1221-1231, 2002.

COMPSTON, A. The story of multiple sclerosis. In: COMPSTON, A. et al. **McAlpine's multiple sclerosis**. 3rd ed. London : Churchill Livingstone, 1999. p. 3-42.

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

COOPER, B. J. et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, London, v. 334, n. 6178, p. 154-156, 1988.

CORREIA, E. L.; NUNES, C. Z.; MAMEDE, L. J. Procedimentos fisioterapêuticos utilizados em pacientes com esclerose múltipla. **Revista de Neurociências**, São Paulo, v, 31, p. 361-377, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000. 223 p.

CRUVEILHIER, J. **Anatomie pathologique du corps humain, ou descriptions avec figures lithographiées et coloriées, des diverses altérations morbides dont le corps humain est susceptible**. 3 ème ed. Paris: Chez J. B. Baillière, 1891. 54 p.

DAHLE, J. C. Natalizumab treatment in multiple sclerosis marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid. **Multiple Sclerosis**, Houndmills, v. 16, n. 2, p. 208-217, 2010.

DAROFF, R. **Neurology in Clinical Practice**. 5nd ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. 89 p.

DAVISON, C.; GOODHART, S. P.; LANDE, R. J. Multiple sclerosis and amyotrophies. **Archives of Neurology Psychiatry**, Chicago, v. 31, p. 264-270, 1984.

DUBOWIZ, V.; BROOKE, M. H. **Muscle biopsy: a modern approach**. 1nd ed. London: W B Saunders, 1983. 11-45 p.

DUMTRU, D.; AMATO, A. A. Neuromuscular junction disorders. In: AMATO, A.; RUSSEL, J. (Ed.). **Neuromuscular disorders**, 2nd ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2008. p. 104-110

FARIAS, A. S. et al. Regulatory T cell induction during *Plasmodium chabaudi* infection modifies the clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, p. 78-49, 2011.

FERREIRA, M. L. b. et al. Epidemiologia de 118 casos de esclerose múltipla com seguimento de 15 anos no centro de referência do Hospital da Restauração de Pernambuco. **Arquivos Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 102-132, 2004.

FINSTERER, J.; PAPIC, L.; AUER-GRUMBACH, M. Motor neuron, never, and neuromuscular junction disease. **Current Opin in Neurology**. Philadelphia, v. 24, n. 5, p. 469-474, 2011.

FISHER, M.; LONG, R. R.; DRACHMAN, D. A. Hand muscle atrophy in multiple sclerosis. **Archives Neurology**, Chicago, v. 40, n. 13, p. 799-811, 1983.

FLETCHER, J. M. et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 162, p. 1-11, 2010.

FOX, R. J. et al. Multiple sclerosis advances in understanding diagnosing and treating the underlying disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, Cleveland, v. 73, n. 1, p. 91-102, 2006.

GARCIN, R.; LAPRESLE, J.; FARDEAU, M. Documents pour servir à l'étude des amyotrophies et des abolitions durables des reflexes tendineux observes dans la sclérose en plaques. **Revue Neurologique**, Paris, v. 107, p. 413-417, 1962.

GARNER, C. C.; KINDLER, S.; GUNDELFINGER, E. D. Molecular determinants of presynaptic active zones. **Current Opinion in Neurobiol**, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 321-327, 2000.

- GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, Chicago, v. 140, n. 6, p. 918-934, 2010.
- GLINA, S. Como diagnosticar e tratar disfunção erétil. **RBM – Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 56, n. 2, 142-147 p., 1999.
- GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil tratado de medicina interna**. 22. ed. Santiago: Saunders Elsevier, 2005 67 p.
- GÓMEZ-PINEDO, U.; RODRIGO, R.; CAULI, O. cGMP modulates stem cells differentiation to neurons in brain in vivo. **Neuroscience**, Oxford, v. 165, n. 4, p. 1275-1283, 2010.
- GRISANTE, A. I.; STANICH, P. Esclerose múltipla: aspectos nutricionais e o papel dos nutrientes específicos. **Conscientia e Saúde**, São Paulo, v. 5, p. 67-74, 2006.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 216 p.
- HASSON, J.; TERR, Y. R. D.; ZIMMERMAN, H. Peripheral neuropathy in multiple sclerosis. **Neurology**, New York, v. 81, n. 7, p. 503-510, 1958.
- HLAING, S. M. et al. Sildenafil promove neuroproteção dos neurônios dos gânglios pélvicos após a ressecção do nervo cavernoso bilateral no rato. **BJU International**, Edinburgh, v. 111, n. 1, p. 159-170, 2013.
- HIER, D. B. Doenças desmielinizantes. In: SAMUELS, M. A. **Manual de terapêutica neurológica**, 2. ed. MEDSI: Rio de Janeiro, 1984. 234 p.
- JACKSON, G.; GILLIES, H.; OSTERLO, I. Past present and future: a 7 year update of Viagra (Sildenafil citrate). **International Journal of Clinical Practice**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 680-691, 2005.
- JELINEK, G. A.; HASSED, C. S. Managing multiple sclerosis in primary care: are we forgetting something? **Quality in Primary Care**, Abingdon, v. 17, n. 1, p. 55-61, 2009.

JEONG, J. Y.; JUE, X. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.158, n. 10, p. 4901-4907, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 542 p.

KAPPOS, L.; FREEDMAN, M. S.; POLMAN, C.H. Long term effect of early treatment with interferon beta-1b after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: 5 year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial. **Lancet Neurology**, London, v. 8, n. 11, p. 987-997, 2009.

KARUSSIS, D. M. et al. Lehmann D. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CR-EAE): treatment and induction of tolerance with high dose cyclophosphamide followed by syngeneic bone marrow transplantation. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 201-210, 1992.

KENEALY, S. J.; PERICAK-VANCE, M. A.; HAINES, J. L. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 143, n. 1-2, p. 7-12, 2003.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**: edição 1999/2000. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 507p.

KRAUS, J.; OSCHMANN, P. The impact of interferon-beta treatment on the blood-brain barrier. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 11, n. 15-16, p. 755-76, 2006.

KUMAR, D. R. et al. Jean-Martin Charcot: the father of neurology. **Clinic Medicine & Research**, Marshfield, v. 9, p. 46-49, 2011.

LANGTRY, H.; MARKHAM, A. SILDENAFIL. **Drugs**, New York, v. 57, n. 6, p. 967-989, 1999.

LEWIS, N. D. et al. A GPBAR1 (TGR5) small molecule agonist shows specific inhibitory effects on myeloid cell activation in vitro and reduces experimental autoimmune encephalitis (EAE) in vivo. **PLoS One**, San Francisco, v. 26, 2014.

LUCCHINETTI, C. F. et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 365, n. 23, p. 2188-2197, 2011.

MACHADO, A. M. **Neuroanatomia funcional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007. 380 p.

MANSON, S. C. Effect of Sildenafil citrate on CBF and BOLD activation in multiple sclerosis patients. In: CONGRESS OF THE EUROPEAN COMMITTEE FOR THE TREATMENT AND RESEARCH IN MULTIPLE SCLEROSIS, 21., 2005, Thessaloniki, Greece. **Poster...** 2005. Disponível em http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=12794&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=22&XNMASKEN_ID=900. Acesso em 30 out. 2014.

MARQUES, A. esclerose em placas. **Jornal de Medicina de Pernambuco**, Recife, v. 2, p.32-38, 1923.

MC ARDLE, W. D.; KATCH, F. I. **Essential of exercise physiology**, 4th ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1994. 853 p.

MCDONALD, W. I. The dynamics of multiple sclerosis: the charcot lecture. **Journal of Neurology**, Berlin, v. 240, n. 1, p. 28-36, 1993.

MEDAER, R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 189-192, 1979.

MEDAER, R. Accelerated cure project: analysis of research into the role of trauma and stress in the etiology of multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 12, p. 257-325, 2007.

MELLERGARD, J. et al. Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid. **Multiple Sclerosis**, Houndmills, v.16, n. 2, p. 208-217, 2010.

MILLER, J. R. Esclerose múltipla. In: ROWLAND, L. P. **Merrit tratado de neurologia**, 10. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002. p. 670-687.

- MILO, R.; KAHANO, E. Multiple sclerosis: geoeptideomology, genetics and the environment. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 387-394, 2010.
- MORALES, A.; GINGELL, C.; COLLINS, M. Clinical safety of oral sildenafil citrate (Viagra) in the treatment of erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, London, v. 10, n. 2, p. 69-74, 1998.
- MOSEMAN, E. A. et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Journal Immunology**, Baltimore, v. 173, n. 7, p. 4433-4442, 2004.
- MOHR, D. C. et al. Therapeutic expectations of patients with multiple sclerosis upon initiating interferon beta-1b: relationship adherence to treatment. **Multiple Sclerosis**, Houndmills, v. 2, n. 5, p. 222-226, 2004.
- MOHR, D. C. et al. Treatment adherence and patient retention in the first year of a Phase III clinical trial for the treatment of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, Houndmills, v. 5, n. 3, p. 192-197, 1999.
- MOREIRA, M. A. et al. Historical aspects of multiple sclerosis. **Revista de Neurologia (Barcelona)**, Barcelona, v. 34, n. 4, p. 378-383, 2002a.
- MOREIRA, M. A. et al. Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da esclerose múltipla: II as evidências para o uso de glicocorticoides e imunomoduladores. **Arquivos Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 60, n. 3B, p. 875-880, 2002b.
- MOREIRA, M. A. et al. Esclerose múltipla: estudo descritivo de suas formas clínicas em 302 casos. **Arquivos Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 58, n. 2B, p. 460-466, 2000.
- MURTHY, N. V; DE CAMILLI, P. Cell biology of the presynaptic terminal. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 26, p. 701-728, 2003.
- NUNES, A. K. S. Sildenafil (Viagra) down regulates cytokines and prevents demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model. **Cytokine**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 540-551, nov. 2012.

O'SULLIVAN , S. B.; SCHMITZ, T. J. **Fisioterapia**: avaliação e tratamento. 4. ed. São Paulo: Manole, 2004. 377p.

O'SULLIVAN, S. **Physical rehabilitation**. 5th ed. Philadelphia: FA Davis Company, 2007, p.136-146.

PAVAN, K. et al. Reabilitação vestibular em pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v. 65, n. 332-335, 2007.

PEDROSA, R. et al. **Introdução à esclerose múltipla**: elaborado pelo Grupo de Estudos de Esclerose Múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. 1. ed. Lisboa: Editora Biogen Idec, 2010. 254 p.

PETAJAN, J. H. Electromyographic findings in multiple sclerosis: remitting signs of denervation. **Muscle & Nerve**, New York, v. 5, n, 9S, p.157-160, 1982.

PIFARRE, P.; PRADO, J.; BALTRONS, M. A. Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 121, n. 4, p. 499-508, 2011.

RAPOSO, C. et al. Sildenafil (Viagra) protective effects on neuroinflammation: the Role of iNOS/NO System in an Inflammatory Demyelination Model. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 60, p. 540-551, 2013.

RICHARDS, D.A.; GUATOMASIM, C.; BETZ, W. J. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. **Neuron**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 551-559, 2000.

RO, Y.I.; ALEXANDER, C. B.; OH, S. J. Multiple sclerosis and hypertrophic demyelinating peripheral neuropathy. **Muscle & Nerve**, Boston, v. 6, n. 4, p. 312-788, 1983.

Simpson, L. L. et al. Identification of the site at which phospholipase A₂ neurotoxins localize to produce their neuromuscular blocking effects. **Toxicon**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 13-26, 1993.

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

SRIRAM S. et al. Comparative study of the presence of *Chlamydia pneumoniae* in cerebrospinal fluid of patients with clinically definite and monosymptomatic multiple sclerosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 6, p. 1332-1337, 2002.

SCHOENE, W. C. et al. Onion bulb formations in the central and peripheral nervous system in association with multiple sclerosis and hypertrophic polyneuropathy. **Brain**, London, v. 100, n. 4, p. 755-773, 1977.

SUBRAMANIAM, U. et al. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications. **Pharmacological Reports**, Krakow, v. 59, n. 2, p. 150-163, 2007.

SVEJGAARD, A. The immunogenetics of multiple sclerosis. **Immunogenetics**, New York, v. 60, n. 6, p. 275-286, 2008.

TAKAMORI, S. et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. **Cell**, Cambridge, v. 127, n. 4, p. 831-846, 2006.

TAKEI, K. et al. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 133, n. 2, p. 1237-1250, 1996.

THOMSON, A.; SKINNER, A.; PIECY, J. **Fisioterapia de Tidy**, 12^a ed. São Paulo: Premier, 1994. 345 p.

TILBERY, C. P et al. Recomendações quanto ao uso de drogas imunomoduladoras na esclerose múltipla. **Arquivos Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 58, n. 3A, p.769-776, 2000.

TILBERY, C. P. **Esclerose múltipla no Brasil**: aspectos clínicos e terapêuticos. 2. ed. São Paulo: Atheneu, São Paulo, 2005. 360 p.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 234 p. 2002.

VAN GELDER, M.; VAN BEKKUM, D. W. Effective treatment of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with pseudoautologous bone marrow transplantation.

Bone Marrow Transplantation, London, v. 18, n. 6, p. 1029-1034, 1996.

VULPIAN, E. F. A. Note sur la sclérose en plaque de la moelle e'pinriere. **L'Union Médicale**, Paris, v. 30, p. 459-465, 1866.

WEBER, S. M.; LEVITZ, S. M. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide- induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomal mechanism. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165, n. 3, p. 1534-1540, 2000.

YOUNG, C. A. Factors predisposing to the development of multiple sclerosis. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 104, n. 5, p. 383-386, 2011.

ZHANG, R. L. et al. Delayed treatment with Sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. **Journal of Neuroscience Research**, New York, v. 83, n. 7, p. 1213-1219, 2006.