

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR  
DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

RODRIGO BRACCINI MADEIRA DA SILVA

**MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA: EFEITOS BENÉFICOS DA  
CTK 01512-2, UMA VERSÃO RECOMBINANTE DA TOXINA Ph $\alpha$ 1 $\beta$  ISOLADA  
DA ARANHA *Phoneutria nigriventer***

Porto Alegre  
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

RODRIGO BRACCINI MADEIRA DA SILVA

**MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA: EFEITOS BENÉFICOS DA CTK  
01512-2, UMA VERSÃO RECOMBINANTE DA TOXINA  $Ph\alpha 1\beta$  ISOLADA DA  
ARANHA *Phoneutria nigriventer***

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. Maria Martha Campos

Porto Alegre  
2018

## Ficha Catalográfica

S586m Silva, Rodrigo Braccini Madeira da

Modelo animal de esclerose múltipla : efeitos benéficos da CTK 01512-2, uma versão recombinante da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  isolada da aranha Phoneutria nigriventer / Rodrigo Braccini Madeira da Silva . – 2018.

123 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos.

1. Esclerose múltipla. 2. Neuroinflamação. 3. CTK 01512-2. 4. Ziconotida. 5. Fingolimode. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Teixeira CRB-10/1974

RODRIGO BRACCINI MADEIRA DA SILVA

**MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA: EFEITOS BENÉFICOS DA CTK  
01512-2, UMA VERSÃO RECOMBINANTE DA TOXINA Ph $\alpha$ 1 $\beta$  ISOLADA DA  
ARANHA *Phoneutria nigriventer***

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Douglas Kazutoshi Sato - PUCRS

---

Dr. Mauricio Reis Bogo (Suplente) - PUCRS

---

Dra. Mônica Ryff Moreira Roca Vianna - PUCRS

---

Dra. Nadja Schroder - PUCRS

---

Dr. Rafael Cypriano Dutra - UFSC

Porto Alegre  
2018

Dedico esta tese aos meus amáveis pais  
que, incansavelmente, estimularam e  
apoiaram o meu crescimento profissional.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial, a minha orientadora, professora Maria Martha Campos, um exemplo de amor à pesquisa científica e que me ensinou a dar os primeiros passos na vida acadêmica. Uma orientação com sua idiossincrasia marcada pela generosidade, compreensão, liberdade intelectual, discussões enriquecedoras, e sobretudo, pela amizade transparente, honesta e respeitosa. Seu trabalho é reconhecido por todos que tiveram o privilégio de com ela aprender muito.

Aos meus pais, Volmir e Tânia, pelo amor incondicional, apoio constante e força nas horas difíceis. A distância não impediu em nada. Um obrigado não seria suficiente, mas não há outra forma de agradecer a não ser dizendo: amo muito vocês.

A Mariana, minha namorada, por ter ressignificado a palavra amor, e por ter sido minha maior companheira durante boa parte desta caminhada. Agradeço diariamente por fazeres parte da minha vida.

Aos meus avós, Aurio, Martha, Gelci (*in memoriam*) e Dalila (*in memoriam*), pelo amor, pela criação, pelos valores ensinados, pelo carinho em todos os momentos da minha vida, e por entender e incentivar as minhas escolhas. Ainda vou precisar muito de tudo isso.

Ao meu tio Zé (José), por me receber de braços abertos logo que cheguei em Porto Alegre, por compartilhar toda sua experiência acadêmica e pessoal. Pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pela torcida constante, mas acima disso, pela amizade inquestionável.

Aos meus sogros, Cláudio e Fátima, pelo amoroso acolhimento que tiveram comigo. Ganhei mais uma família em minha vida.

Aos colegas do Intox (Centro de Pesquisa de Toxicologia e Farmacologia), pelos aprendizados científicos e não-científicos na copinha, por tornar o ambiente profissional um local agradável de estar, e por terem me ensinado muito sobre amizade.

Ao professor Marcus Vinicius, pela colaboração entre UFMG e PUCRS, e por tornar exequíveis as ideias científicas.

Aos colaboradores do InsCer (Instituto do Cérebro), que agora posso chamar de amigos, Samuel e Gianina, pelos ensinamentos neurocientíficos e conversas descontraídas.

Aos meus amigos e amigas de Uruguaiana e Porto Alegre, por tornarem os meus dias mais felizes e leves.

E por fim, a todos aqueles que, nomeados ou não, estiveram presentes em minha vida. O estar com vocês possibilitou mudanças e transformações em mim.

“A preocupação com a administração da vida parece distanciar  
o ser humano da reflexão moral.”  
Zygmunt Bauman (1925 – 2017)

## RESUMO

Os canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) desempenham um papel importante nas doenças neuroinflamatórias, como na esclerose múltipla (EM). Foram investigados os efeitos do tratamento com o peptídeo recombinante, CTK 01512-2, um bloqueador dos CCVD do tipo N/TRPA1 - responsáveis pelo influxo de cálcio, no modelo animal de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos. Os efeitos dessa molécula foram comparados aos exibidos pela ziconotida – um bloqueador seletivo dos CCVD do tipo N, usado clinicamente para dor crônica. As ações do CTK 01512-2 também foram comparadas àquelas exercidas pelo fingolimode – um fármaco utilizado por via oral para o tratamento da EM. A administração intratecal (i.t.) de CTK 01512-2 preveniu marcadamente a hiperalgesia, perda de peso corporal, esplenomegalia, escores clínicos e neurológicos relacionados a EAE, comprometimento na coordenação motora e memória espacial, com eficácia comparável à observada para ziconotida e fingolimode. Essa molécula mostrou um perfil favorável nas mudanças neuroinflamatórias induzidas por EAE, incluindo infiltrado inflamatório, desmielinização, aumento de citocinas pró-inflamatórias, ativação glial e no metabolismo da glicose no cérebro e medula espinhal. A recuperação da memória espacial, redução dos níveis séricos de leptina, além do aumento dos níveis centrais e periféricos da citocina anti-inflamatória, IL-10, foram modulados apenas pelo CTK 01512-2, quando administrado pela via i.t. A administração sistêmica (i.v.) de CTK 01512-2 também reduziu os sinais e sintomas evocados por EAE, de forma semelhante ao fingolimode, administrado por via oral. A ziconotida não teve efeito significativo quando administrada pela via i.v. Coletivamente, esses resultados indicam que o CTK 01512-2 melhorou significativamente a resposta neuroinflamatória no modelo de animal de EM em camundongos, com eficácia superior quando comparado com a ziconotida, apontando essa molécula como um adjuvante promissor no tratamento da EM.

**Palavras-chave:** Esclerose múltipla. Neuroinflamação. CTK 01512-2. Sinalização de cálcio. Ziconotida. Fingolimode.



## ABSTRACT

Voltage-gated calcium channels (VGCC) play a critical role in neuroinflammatory diseases, such as multiple sclerosis (MS). We investigated the effects of the recombinant peptide CTK 01512-2, an inhibitor of N-type VGCC/TRPA1-mediated calcium influx, in the mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The effects of this molecule were compared to those displayed by ziconotide - a selective N-type VGCC blocker clinically used for chronic pain, and fingolimod - an orally active drug employed for MS treatment. The intrathecal (i.t.) administration of CTK 01512-2 markedly prevented hyperalgesia, body weight loss, splenomegaly, MS-like clinical and neurological scores, impaired motor coordination and spatial memory, with an efficacy comparable to that observed for ziconotide and fingolimod. This molecule displayed a favourable profile on EAE-induced neuroinflammatory changes, including inflammatory infiltrate, demyelination, increased pro-inflammatory cytokines, glial activation and glucose hypermetabolism in brain and spinal cord. The recovery of spatial memory, besides a reduction of serum leptin levels, allied to central and peripheral elevation of the anti-inflammatory cytokine IL-10, were solely modulated by CTK 01512-2, dosed intrathecally. The systemic i.v. administration of CTK 01512-2 also reduced the EAE-elicited MS-like symptoms and signals, similarly to that seen in animals that received fingolimod orally. Ziconotide lacked any significant effect when dosed by i.v. route. Collectively, these results indicate that CTK 01512-2 greatly improved the neuroinflammatory responses in a mouse model of MS, with a higher efficacy when compared to ziconotide, pointing out this molecule as a promising adjuvant for MS management.

**Keywords:** Multiple sclerosis. Neuroinflammation. CTK 01512-2. Calcium signalling. Ziconotide. Fingolimod.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> A prevalência global de EM.....	14
<b>Figura 2.</b> A prevalência nacional de EM por região.....	14
<b>Tabela 1.</b> Fatores ambientais e estilo de vida associados ao risco de desenvolver EM .....	15
<b>Figura 3.</b> Desregulação imunológica periférica na EM.....	18
<b>Figura 4.</b> Os sintomas e comorbidades da EM.....	20
<b>Figura 5.</b> Descrição do curso clínico da EM para forma recidivante (1996 vs 2013).....	21
<b>Figura 6.</b> Descrição do curso clínico da EM para forma progressiva (1996 vs 2013) .....	22
<b>Tabela 2.</b> Os critérios de McDonald para diagnóstico da EM.....	24
<b>Figura 7.</b> Escala expandida do estado de incapacidade de Kurtzke .....	25
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos canais de cálcio voltagem-dependentes .....	32
<b>Figura 8.</b> Topologia transmembrana e composição das subunidades dos canais de cálcio voltagem-dependentes .....	33
<b>Tabela 4.</b> Peptídeos isolados do veneno da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i> .....	34
<b>Figura 9.</b> Representação das vias de entrada do cálcio em condições fisiológicas e inflamatórias .....	36

## LISTA DE SIGLAS

<b>AcM</b>	Anticorpo monoclonal
<b>APC</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>CCVD</b>	Canais de cálcio voltagem-dependentes
<b>CD</b>	Cluster de diferenciação
<b>CIS</b>	Síndrome clinicamente isolada
<b>DTM</b>	Terapias modificadoras da doença
<b>EAE</b>	Encefalomielite autoimune experimental
<b>EBV</b>	Vírus Epstein-Barr
<b>EDSS</b>	Escala expandida do estado de incapacidade
<b>EM</b>	Esclerose múltipla
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FOXP3</b>	<i>Forkhead box P3</i>
<b>Hab</b>	Habitantes
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>MBP</b>	Proteína básica da mielina
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>MOG</b>	Glicoproteína de oligodendrócitos da mielina
<b>MSIF</b>	Federação Internacional de Esclerose Múltipla
<b>MRI</b>	Ressonância magnética por imagem
<b>NK</b>	Células <i>natural killer</i>
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PLP</b>	Proteína lipoproteica
<b>PP</b>	Primária progressiva
<b>RIS</b>	Síndrome radiológica isolada
<b>RS</b>	Rio Grande do Sul
<b>RR</b>	Recorrente-remitente
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SP</b>	Secundária progressiva

<b>Th</b>	Células T <i>helper</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>Tregs</b>	Células T reguladoras
<b>TRPA1</b>	Receptores de potencial transitório anquirina 1
<b>TRPV1</b>	Receptores de potencial transitório vaniloide 1

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

<b>C</b>	Celsius
<b>cm</b>	Centímetro
<b>h</b>	Hora
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>kg</b>	Quilograma
<b>m</b>	Metro
<b>M</b>	Molar
<b>min</b>	Minuto
<b>mg</b>	Miligramma
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ng</b>	Nanograma
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>pmol</b>	Picomol
<b>s</b>	Segundo
<b>US\$</b>	Dólar
<b>€</b>	Euro
<b>~</b>	Aproximadamente
<b>&gt;</b>	Maior que
<b>±</b>	Mais ou menos
<b>α</b>	Alpha
<b>β</b>	Beta
<b>γ</b>	Gamma
<b>δ</b>	Delta

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	12
1.1	Esclerose múltipla.....	12
1.2	Epidemiologia, fatores de risco e fisiopatologia da EM.....	13
1.3	Sintomas, formas clínicas, diagnóstico e tratamento da EM .....	19
1.4	Modelo animal de encefalomielite autoimune experimental.....	28
1.5	<i>Phoneutria nigriventer</i> e canais de cálcio voltagem-dependentes.....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
3.1	Objetivo geral .....	38
3.2	Objetivos específicos .....	38

### CAPÍTULO II

	<b>MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL</b> .....	40
--	--	----

### CAPÍTULO III

	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	108
--	-----------------------------------	-----

### CAPÍTULO IV

	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	110
--	---------------------------	-----

	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	111
--	---	-----

	<b>ANEXO A</b> – Aprovação da CEUA .....	120
--	--	-----

	<b>ANEXO B</b> – Comprovante de submissão do manuscrito .....	121
--	---	-----

## CAPÍTULO I

### 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 1.1 Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, autoimune e desmielinizante, que acomete o sistema nervoso central (SNC), encéfalo e medula espinhal, causando incapacidade física e mental quase irreversíveis (Hemmer *et al.*, 2017). As primeiras descrições clínicas e patológicas da EM foram realizadas no início do século 19 por Robert Carswell (1793-1857), Jean Cruveilhier (1791-1874), Friedrich von Frerichs (1819-1885) e Carl von Rokitansky (1804-1878) (Ransohoff, 2012). O médico neurologista Jean-Martin Charcot (1825–1893) foi o primeiro a reconhecer a EM como uma doença distinta, na segunda metade do século 19. Devido às suas observações, Charcot denominou a doença como: esclerose em placas. Os três sinais da EM conhecidos atualmente como tríade de Charcot são: nistagmo (movimentos involuntários dos olhos), tremor intencional e, fala telegráfica (Compston, 1988). Esses sintomas não são exclusivos da EM. Além disso, Charcot descreveu que seus pacientes “tinham um nítido enfraquecimento de memória” e “formação lenta de concepções” (Joshi *et al.*, 2014). Por outro lado, diários pessoais e obras históricas indicam as descrições da doença por pelo menos 50, e talvez 500 anos antes (resumidamente em <http://ms-society.ie/pages/historical-overview/>).

A EM é a causa mais comum do uso de cadeira de rodas entre 18-64 anos, e a terceira causa mais comum de paralisia (após acidente vascular encefálico e lesão medular), em todas as faixas etárias (Giovannoni *et al.*, 2016). A doença, portanto, possui um potencial incapacitante e afeta, negativamente, a qualidade vida dos portadores e seus familiares.

A patologia é caracterizada pela produção de autoanticorpos contra os componentes da bainha de mielina dos axônios neuronais. Diferente das doenças neurodegenerativas, a EM afeta, preferencialmente, indivíduos adultos jovens (20 a 40 anos), sendo 3-4 vezes mais frequente em mulheres e em indivíduos de cor branca (Ransohoff *et al.*, 2015; Olsson *et al.*, 2017). Possui um grande impacto socioeconômico, justamente por atingir pessoas jovens, podendo levar à incapacidade neurológica precoce. Um estudo recente publicado em 2016, mostrou que o custo médio por ano de um paciente brasileiro portador de EM é de aproximadamente R\$ 57.000, levando em consideração custos diretos: consultas médicas, hospitalizações, tratamentos medicamentosos, fisioterapia, fonoterapia, cadeira de rodas, adaptações no lar onde vive, entre outros. Dentre os custos indiretos destacam-se a perda da

produtividade no trabalho devido à licença pela doença e invalidez, bem como, a aposentadoria precoce (da Silva *et al.*, 2016).

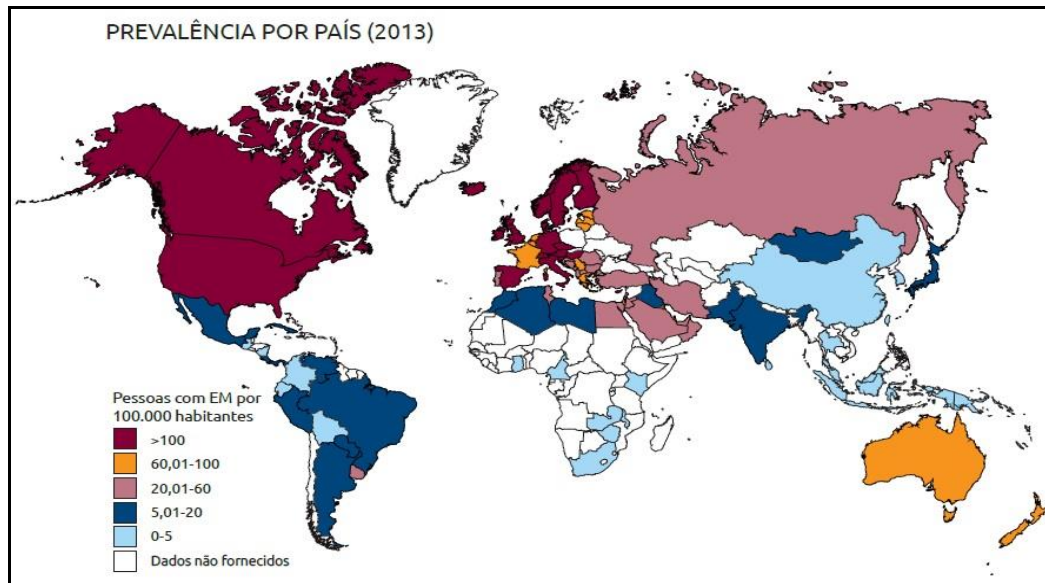
Nos Estados Unidos e no Canadá, estima-se que uma pessoa com EM (EDSS > 6; escala expandida do estado de incapacidade; 0 = função neurológica normal, 6 = necessidade de auxílio para caminhar) pode custar ao governo cerca de US\$ 21.000/ano (O'Connell *et al.*, 2014). Na Europa, os valores por paciente podem atingir € 37.000 para EDSS 4-6 (Karampampa *et al.*, 2012). Esse custo anual por pessoa é maior do que para outras doenças crônicas, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e diabetes. Ademais, o custo anual para a sociedade europeia foi estimado em € 15,5 bilhões (Giovannoni *et al.*, 2016).

## 1.2 Epidemiologia, fatores de risco e fisiopatologia da EM

Globalmente, segundo o último levantamento realizado pela Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF), órgão que congrega 44 organizações ao redor do mundo (124 países; 79% da população mundial), há uma estimativa de aproximadamente 2,5 milhões de pessoas portadoras da doença, com taxa de crescimento de 10% nos últimos cinco anos (MSIF, 2013a). A distribuição geográfica da EM é bastante diversificada (**Figura 1**). As populações dos países situados ao norte da Europa e ao norte da América são consideradas de alto risco, com uma prevalência de 100-200 casos/100 mil habitantes (hab). O índice é ainda maior em países como: Canadá, 291 casos/100 mil hab; San Marino, 250 casos/100 mil hab e Dinamarca 227 casos/100 mil hab. Áreas de médio risco: 60-99 casos/100 mil hab, incluem o sul da Europa e o norte da Oceania, enquanto México e Japão são considerados como áreas de baixo risco (5-20/100 mil hab). Na América Latina, a prevalência é maior nos países que receberam mais imigrantes europeus: Argentina, 25,6 casos/100 mil hab e Uruguai, 21 casos/100 mil hab. Aqueles que mantiveram maior relevância nativa na composição demográfica apresentam taxas pequenas: Bolívia, 1,5 casos/100 mil hab; Peru, 3,8 casos/100 mil hab e Equador, 5,05 casos/100 mil hab (MSIF, 2013b; Howard *et al.*, 2016).

No Brasil, segundo dados de 2014, do Ministério da Saúde e da Associação Brasileira de Esclerose Múltipla, estima-se que aproximadamente 30-35 mil pessoas são afetadas pela doença. A descendência europeia ajuda a entender por que os índices mais elevados no Brasil estão no Sudeste (17-18 casos/100 mil hab) e, sobretudo, no Sul (26 casos/100 mil hab) (**Figura 2**), que recebeu grande fluxo imigratório de italianos e alemães no século 19 (Machado, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2016). A maior prevalência nacional já registrada é a do município de Santa Maria (RS): 27,2 casos/100 mil hab. Entretanto, como a medição municipal é feita em poucas cidades, a metodologia varia de acordo com o levantamento (da Gama Pereira *et al.*, 2015).





**Figura 1. A prevalência global de EM.** Extraído de: Federação Internacional de Esclerose Múltipla (número de licença para uso da imagem: 4174930004551; *Copyright Clearance Center*) (MSIF, 2013a).



**Figura 2. A prevalência nacional de EM por região.** Extraído de: Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa em Esclerose Múltipla (autorização para uso da imagem: Dr. Jefferson Becker; Presidente Executivo do Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa em Esclerose Múltipla; 24/08/17) (BCTRIMS, 2016).

A EM é uma doença complexa e a etiologia ainda permanece desconhecida. Além de variantes genéticas, estilo de vida e fatores ambientais podem contribuir significativamente para o risco da doença, ou seja, a EM é multifatorial. Cabe salientar que a combinação de dois ou mais fatores (genético e ambiental) parece ser essencial para o desenvolvimento da patologia. Dentre os fatores ambientais e estilo de vida com maior nível de evidência estão: a exposição ao tabaco, infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), obesidade na adolescência, falta de exposição

à luz solar e baixos níveis de vitamina D. Estes podem ser os principais gatilhos para deflagrar a doença, contribuindo, também, para o prognóstico desfavorável (**Tabela 1**) (Jorg *et al.*, 2016; Olsson *et al.*, 2017).

Um outro exemplo é o gradiente latitudinal, isto é, há um aumento gradual da incidência e prevalência de EM em países mais afastados da linha do Equador. Isso poderia estar relacionado à baixa produção de vitamina D, com consequente alteração da atividade imunológica (Hedstrom *et al.*, 2016). Em um estudo pioneiro, Munger *et al.* (2006) demonstraram que o aumento dos níveis de vitamina D, em particular, antes dos 20 anos de idade, está relacionado com menor risco de EM em fases mais avançadas da vida. Estudos sobre a suplementação com vitamina D e a exposição ao sol têm corroborado com o importante papel da vitamina D em reduzir o risco de EM (Munger *et al.*, 2006; Cortese *et al.*, 2015). Recentemente, níveis elevados de vitamina D foram correlacionados com a diminuição do dano axonal, através da quantificação dos neurofilamentos de cadeia leve no líquido cefalorraquidiano (LCR), de pessoas com EM (Sandberg *et al.*, 2016).

Factor	OR	HLA gene interaction	Combined OR (nongenetic factor + HLA allele)	Effect during adolescence	Immune system implied	Level of evidence
Smoking	~1.6	Yes	14	No	Yes	+++
EBV infection (seropositivity)	~3.6	Yes	~15	Yes	Yes	+++
Vitamin D level <50nM	~1.4	No	NA	Probably	Yes	+++
Adolescent obesity (BMI >27 at age 20 years)	~2	Yes	~15	Yes	Yes	+++
CMV infection (seropositivity)	0.7	No	NA	Unknown	Yes	++
Night work	~1.7	No	NA	Yes	Yes	++
Low sun exposure	~2	No	NA	Probably	Yes	++
Infectious mononucleosis	~2	Yes	7	Yes	Yes	++
Passive smoking	~1.3	Yes	6	No	Yes	+
Organic solvent exposure	~1.5	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	+
Oral tobacco/nicotine	0.5	No	NA	Unknown	Yes	+
Alcohol	~0.6	No	NA	Unknown	Yes	+
Coffee	~0.7	No	NA	Unknown	Yes	+

**Tabela 1. Fatores ambientais e estilo de vida associado ao risco de desenvolver EM.** Extraído de: *Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis* (número de licença para uso da imagem: 4174930004551; *Copyright Clearance Center*) (Olsson *et al.*, 2017). BMI, índice de massa corporal; CMV, citomegalovírus; EBV, vírus Epstein-Barr; HLA, antígeno leucocitário humano; MS, esclerose múltipla; NA, não aplicável; OR, *Odds ratio* = razão de possibilidades.

Nos últimos 7 anos, estudos consistentes evidenciaram o papel da obesidade no risco de EM. Estudos de coorte associaram obesidade durante a adolescência com risco futuro de desenvolver EM em mulheres (Munger *et al.*, 2009). A associação foi mais forte para índice de

massa corporal > 27 (sobrepeso: 25-30). Outrossim, a obesidade está associada ao aumento do risco de EM pediátrica (Langer-Gould *et al.*, 2013). Os mecanismos celulares e moleculares que conectam a obesidade com a patogênese da EM estão distantes de serem esclarecidos. Todavia, existem pelo menos três propostas de vias de sinalização: (i) a obesidade é caracterizada por uma inflamação de baixo grau, em que níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios são produzidos no tecido adiposo. De fato, foi descrito, na obesidade, a promoção de respostas imunes favoráveis às células T *helper* tipo 1 (Th1) que, por sua vez, secretam citocinas pró-inflamatórias, incluindo interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF), acarretando na diminuição da função das células T reguladoras (Tregs); (ii) a obesidade está associada a níveis aumentados de leptina, um mediador envolvido na inflamação e; (iii) a obesidade também leva à diminuição da biodisponibilidade de vitamina D, que promove processos pró-inflamatórios (Wortsman *et al.*, 2000; Lumeng *et al.*, 2007; Matarese *et al.*, 2010; Procaccini *et al.*, 2015). Cabe destacar que as vias de sinalização citadas acima não são mutuamente excludentes e podem se sobrepor.

Uma extensa literatura apoia a hipótese de que a infecção por EBV aumenta o risco de EM. Contudo, como há muitos outros fatores ligados à EM, é difícil estabelecer uma relação causal entre EBV e a doença. As evidências circunstanciais são convincentes, de acordo com uma metanálise (Handel *et al.*, 2010), as pessoas que tiveram mononucleose infecciosa não-silenciosa possuem um risco duas vezes maior de desenvolver EM. Corroborando com a associação entre EBV e a doença, indivíduos com EM possuem níveis maiores de anticorpos contra o antígeno nuclear de EBV (EBNA1) e um fragmento específico do mesmo (aminoácidos 385-420) (Sundstrom *et al.*, 2009; Sundqvist *et al.*, 2012). Dentre as explicações propostas para as infecções induzirem EM estão: (i) mimetismo molecular e (ii) ativação *bystander*. Na primeira situação, o microrganismo contém antígenos que atuam em reação cruzada com autoantígenos - assim, respostas imunológicas ao microrganismo resultam em reações contra os próprios tecidos. Na segunda, a infecção viral sobre um tecido-alvo causa a destruição do tecido e liberação de autoantígenos sequestrados. Desta forma, linfócitos específicos para estes autoantígenos são recrutados para a área lesada. Os autoantígenos sequestrados são aqueles que, por alguma razão, não foram apresentados aos linfócitos imaturos no timo e na medula óssea e, portanto, não são reconhecidos como próprios pelos linfócitos maduros nos tecidos periféricos (Tejada-Simon *et al.*, 2003).

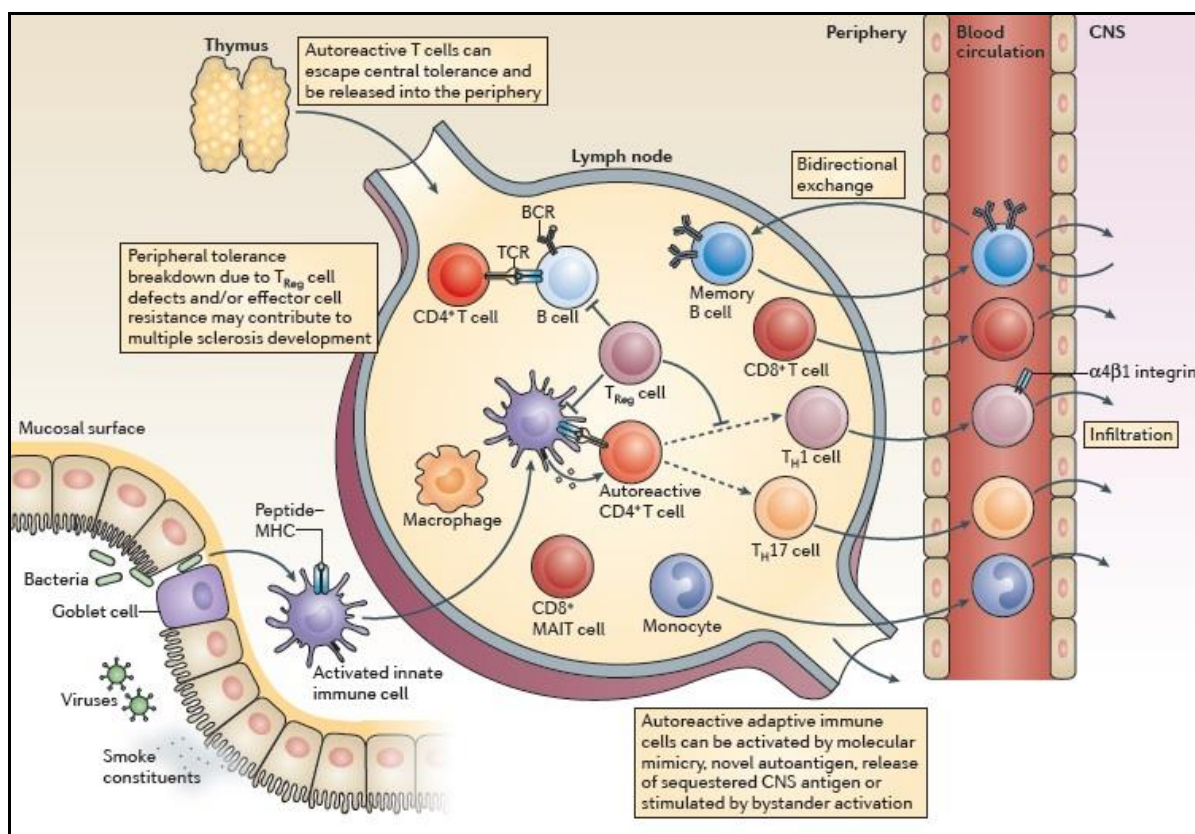
O tabagismo tem uma relação dose-resposta sobre o risco de desenvolver EM. (Hedstrom *et al.*, 2009). Níveis elevados de cotinina, o principal produto da biotransformação da nicotina, foram identificados no soro ou plasma ( $\geq 10$  ng/ml) de pacientes, antes de

desenvolverem EM (Salzer *et al.*, 2013). Adicionalmente, a exposição passiva à fumaça do cigarro foi associada a um maior risco de EM, sugerindo, sobretudo, que mesmo em pequenas proporções de irritação pulmonar, a fumaça também é nociva. Com isso, se a associação entre fumar e o risco à EM é causada por irritação pulmonar inespecífica, pode-se considerar fatores como a poluição do ar, como um gatilho da inflamação do SNC (Hedstrom *et al.*, 2011). Outro estudo recente mostrou que a incidência de EM em mulheres tabagistas, com consumo acima de 15 cigarros/dia, é 1,8 vezes maior do que em mulheres não fumantes (Goodin, 2016). Logo, os estudos evidenciam que o tabaco pode tanto estar relacionado com o risco de desenvolver EM, quanto no mau prognóstico.

Sabe-se que a EM tem características autoimunes, podendo ser decorrente da interação de um ou mais fatores ambientais em indivíduos com predisposição genética. Dessa forma, a doença é muitas vezes classificada como poligênica, isto é, diversos genes influenciam na susceptibilidade à doença. Os genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II são modificadores relevantes do risco à EM: as variantes dos genes de classe II codificam produtos que apresentam antígenos para linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e os de classe I para linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Na EM, particularmente, a variante de classe II, HLA-DRB1\*15:01, tem uma grande associação com o aumento do risco à EM (*Odds ratio* = OR ~3), enquanto que a variante de classe I, HLA-A\*02, é relacionada com a proteção da doença (OR ~0,6). A ausência de HLA-A\*02 e a presença de DRB1\*15:01 possui uma combinação de OR ~5 (International Multiple Sclerosis Genetics *et al.*, 2013; Moutsianas *et al.*, 2015). O HLA-DR15 parece representar a região mais consistentemente ligada à doença, com um risco genético de 10-60% (Barcellos *et al.*, 2003; Sospedra *et al.*, 2016). A influência genética é também sugerida pelo fato de que a taxa de concordância da doença em gêmeos monozigóticos é cinco vezes maior do que em gêmeos dizigóticos (Sospedra *et al.*, 2005).

A imunopatologia da EM ainda não está totalmente elucidada. Entretanto, pode ser dividida nas seguintes fases principais, segundo a teoria mais aceita: (i) auto-reatividade periférica de linfócitos: inicia com uma reação imune celular mediada por linfócitos T que, por sua vez, são ativados no sangue periférico e nos gânglios linfáticos. Os componentes proteicos da mielina são considerados autoantígenos (ex: MBP, proteína básica da mielina; MOG, glicoproteína de oligodendrócitos da mielina) responsáveis pela resposta autoimune observada na doença; (ii) ruptura da barreira hematoencefálica e infiltração de células imunes: logo após ativação, os linfócitos T adquirem a capacidade de se expandir clonalmente, produzir diferentes citocinas e aumentar a expressão de selectinas, integrinas (VLA-4 e LFA-1) e outras moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) em sua superfície, para alcançar o parênquima cerebral; (iii)

inflamação, desmielinização e degeneração neuroaxonal: após a migração para o SNC, células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> diferenciadas (Th1 e Th17), células B e células imunes inatas promovem um ambiente inflamatório e, conseqüentemente, levam à lesão axonal, ou seja, levam à perda da bainha de mielina, com conseqüente prejuízo da sinalização neuronal (**Figura 3**) (Dendrou *et al.*, 2015; Korn *et al.*, 2017). Além disso, foi aventado um importante papel para a interação entre linfócitos B e T no desenvolvimento da fisiopatologia da EM, sobretudo, na função de apresentação de antígenos entre as células, o que foi recentemente debatido no congresso mundial de EM, em Paris (ECTRIMS, 2017).



**Figura 3. Desregulação imunológica periférica na EM.** Durante o estabelecimento da tolerância central no timo, a maioria das células T auto-reativas são deletadas. No entanto, na EM o processo é defeituoso e algumas células T auto-reativas são liberadas para a periferia. Em condições imunológicas saudáveis, os mecanismos de tolerância periférica mantêm as células sob controle. Se a tolerância for quebrada - através da diminuição da função das células Tregs e/ou aumento da resistência dos mecanismos supressores das células B e T efetoras - as células B (auto-reativas ao SNC) e as células T podem ser ativadas na periferia para se tornarem células efetoras agressivas. Uma vez ativadas, células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> diferenciadas (Th1 e Th17), linfócitos B e células imunes inatas podem infiltrar no SNC, desencadeando um processo inflamatório e levando ao dano tecidual. MHC, complexo de histocompatibilidade; BCR, receptor de células B; TCR, receptor de células T. Extraído de: *Immunopathology of Multiple Sclerosis* (número de licença para uso da imagem: 4174930467882; Copyright Clearance Center) (Dendrou *et al.*, 2015).

As células Th podem secretar diferentes citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas, radicais livres e óxido nítrico, promovendo estresse oxidativo no axônio neuronal. Dependendo das citocinas presentes, os linfócitos T podem assumir quatro fenótipos: Th1, Th2, Th17 ou Tregs. Principalmente, Th1 e Th17 podem induzir dano à bainha da mielina

e promover desmielinização mediada pela ação celular, além de ativar macrófagos, astrócitos e microglia em lesões ativas. Também pode haver destruição de oligodendrócitos, estas células, por sua vez, são responsáveis pela produção de mielina (Stromnes *et al.*, 2008; Dendrou *et al.*, 2015; Ransohoff *et al.*, 2015; Saab *et al.*, 2016).

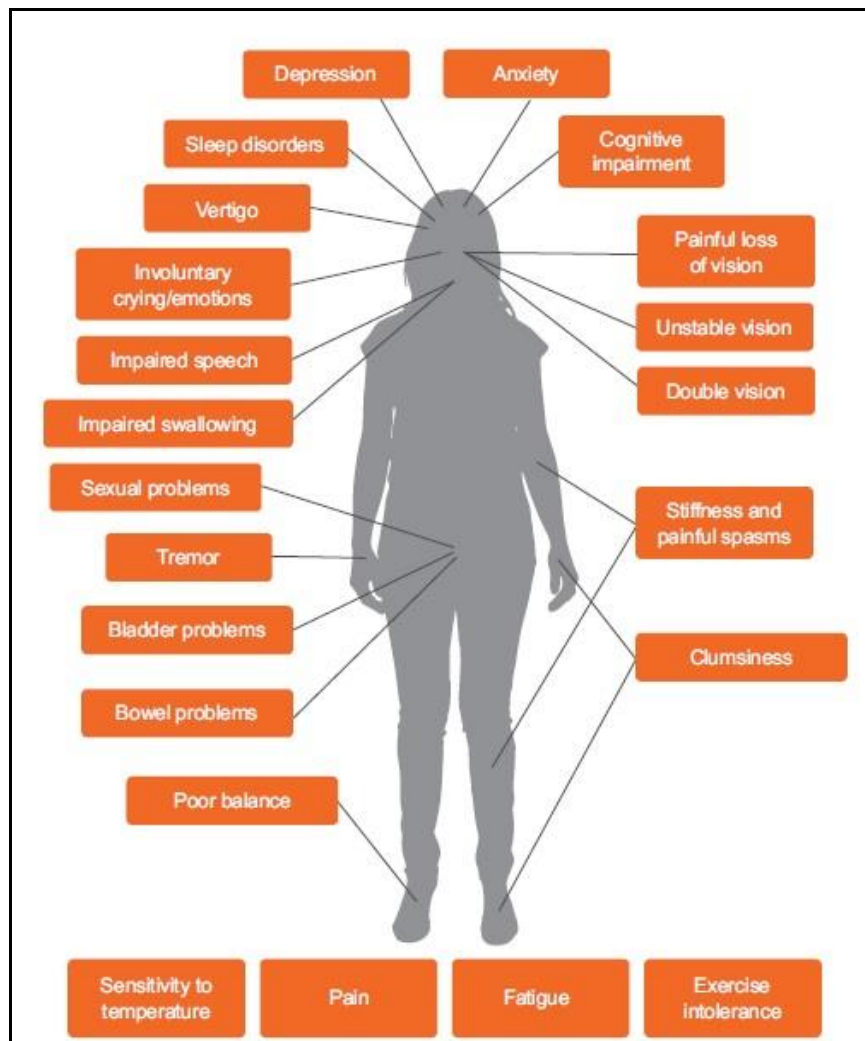
Outra explicação plausível para a auto-reatividade de células T e B na EM seria por meio das funções defeituosas das células Tregs como, por exemplo, as células Tregs CD4<sup>+</sup> expressando *Forkhead box P3* (FOXP3) e células Tregs tipo 1 (TR1) que produzem interleucina (IL)-10 (Venken *et al.*, 2008a). A desregulação da interação entre célula efetora/reguladora ocorre na EM resultando no surgimento de células imunes adaptativas auto-reativas que são capazes de infiltrar e promover danos no SNC (**Figura 3**) (Dendrou *et al.*, 2015). Estudos têm relatado uma diminuição da frequência e/ou capacidade supressiva de células Tregs, bem como, uma frequência alterada de subconjuntos específicos de células Tregs (como células CD39<sup>+</sup>), na periferia de pacientes com EM, em comparação com grupos controles (Fletcher *et al.*, 2009). Tais defeitos foram atribuídos à frequência reduzida de células Tregs *naïve* circulantes de origem tímica (identificadas como CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>), juntamente com a expansão ineficaz de população de células Tregs de memória (Venken *et al.*, 2008b).

### 1.3 Sintomas, formas clínicas, diagnóstico e tratamento da EM

As manifestações clínicas da EM são atribuídas ao aparecimento de lesões na substância branca do SNC, visualizadas em exames de ressonância magnética por imagem (MRI) (Goverman, 2009). Atualmente, também se sabe que a doença acomete a substância cinzenta (Calabrese *et al.*, 2015). Devido à destruição da bainha de mielina, ocorre mais comumente o comprometimento do tronco cerebral, cerebelo, nervo óptico, ventrículo lateral, corpo caloso, medula espinhal cervical, com danos aos axônios e presença de cicatrizes gliais, juntamente com a presença de infiltrados inflamatórios (Goverman, 2009; Becher *et al.*, 2017). Normalmente o dano ao SNC é detectado pela primeira vez quando o sintoma clínico aparece. Os sintomas podem assumir a forma de ataque (também conhecido como recaída, crise, surto) quando a lesão se desenvolve em um local que desestabiliza, significativamente, a função nervosa, embora a maioria das lesões (~90%) não leve diretamente à recidiva. Ocasionalmente, as lesões são detectadas antes do aparecimento dos sintomas clínicos, em escaneamento cerebral, que é conduzido para outra finalidade (por exemplo, dores de cabeça) (Okuda *et al.*, 2009).

Os sintomas experimentados por uma pessoa com EM podem variar de acordo com a localização das lesões no SNC. Dentre os sintomas clínicos mais comuns estão:

comprometimento da visão devido à inflamação do nervo óptico (neurite óptica), fraqueza dos membros (fadiga), déficits de coordenação motora, desequilíbrio, tremores, distúrbios cognitivos (memória) e sensitivos (formigamento), perda da libido, assim como, frequência na micção (**Figura 4**) (Ghasemi *et al.*, 2017; Vidal-Jordana *et al.*, 2017). Adicionalmente, cerca de 15 a 40% dos pacientes com EM apresentam dor persistente (Harrison *et al.*, 2015). Essa dor tem sido descrita como uma alteração neuropática central (incluindo disestesia das extremidades e neuralgia trigeminal), caracterizada por dores nas costas, espasmos tônicos dolorosos e cefaleia (O'Connor *et al.*, 2008).



**Figura 4. Os sintomas e comorbidades da EM.** Extraído de: *Brain health: time matters in multiple sclerosis* (número de licença para uso da imagem: 4174931348308; *Copyright Clearance Center*) (Giovannoni *et al.*, 2016).

A seguir, são apresentados os depoimentos pessoais de alguns pacientes, a fim de prover uma melhor definição dos sinais e sintomas da EM, com os seus diferentes padrões de expressão:

### Relato em primeira pessoa (Mayo Clinic, 2010).

“A coordenação motora fina da minha mão esquerda foi afetada. Algumas vezes minha fala ficou arrastada, e a rigidez das minhas pernas me fazia caminhar com extrema dificuldade e cansaço. Eu passei de uma pessoa muito saudável e fisicamente ativa para ser uma pessoa deficiente. Minha vida mudou por inteiro”.

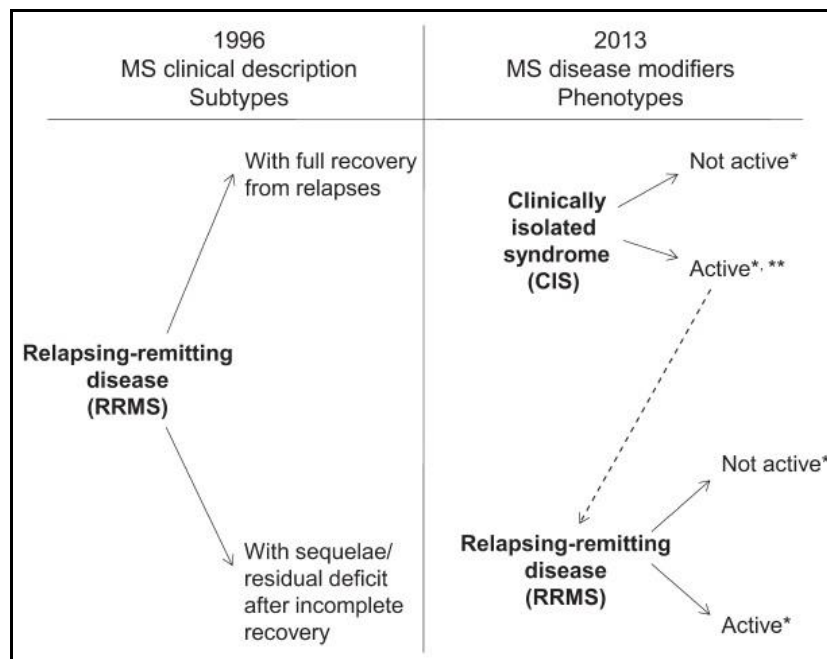
### Relato em primeira pessoa (Borreani *et al.*, 2014).

“Eu sempre preciso de ajuda. Isso realmente me mata. Eu parei de sair porque tenho medo de fazer xixi nas calças. Eu sempre estou com medo da incontinência repentina e de criar um mal cheiro”.

### Relato em primeira pessoa (Folha de São Paulo. Reportagem de: 03/08/17).

“Hoje, enfrento dor, fadiga e dificuldade de locomoção, mas as pessoas só enxergam uma mulher bem forte e corada fazendo chororô. Na fila preferencial do supermercado, sofri agressões verbais: uma senhora disse que eu estava me aproveitando e que minha única deficiência era a falta de educação”.

As pessoas com lesões cerebrais com ausência de sintomas clínicos são classificadas com síndrome radiológica isolada (RIS). Cerca de um terço das pessoas com RIS vão experimentar, pelo menos, uma crise dentro de 5 anos. Um ataque inicial é conhecido como síndrome clinicamente isolada (CIS). Muitas pessoas (aproximadamente 30-70%) com CIS desenvolverão EM, mesmo que não possam inicialmente preencher os critérios diagnósticos completos da doença (**Figura 5**) (Okuda *et al.*, 2014).

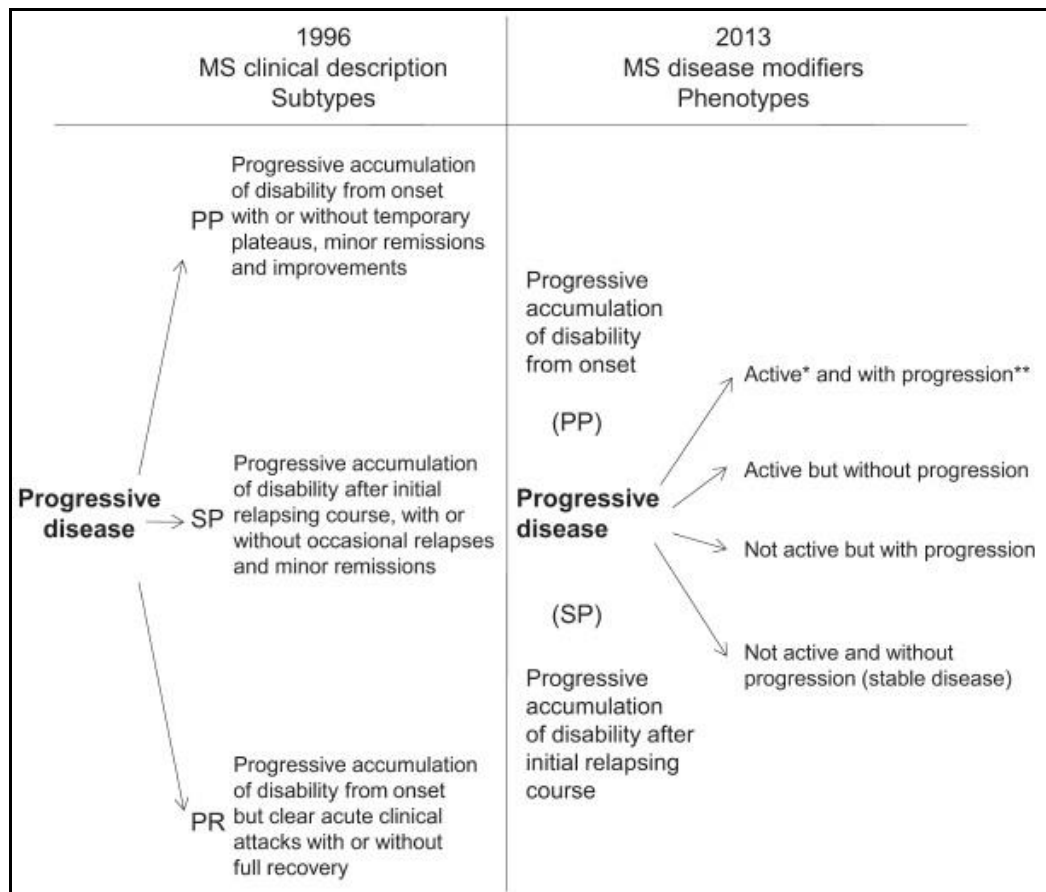


**Figura 5. Descrição do curso clínico da EM para forma recidivante (1996 vs 2013).** Extraído de: *Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions* (número de licença para uso da imagem: 4174932335607; Copyright Clearance Center) (Lublin *et al.*, 2014).

A doença pode se manifestar com diferentes formas clínicas, sendo classificada como: recorrente-remittente (RR), secundária progressiva (SP) e primária progressiva (PP) (**Figura 5 e 6**). EM-RR é caracterizada pela manifestação de sintomas neurológicos com recuperação



plena ou com déficits residuais. Aproximadamente 85-90% dos pacientes manifestam essa forma. Ao longo de 10 anos do início da doença, cerca de 80% dos pacientes com EM-RR passam a apresentar a forma progressiva, ou seja, a fase que se convencionou chamar de EM-SP. Esta forma é considerada mais grave, pois ocorre deterioração contínua das funções neurológicas, independentemente dos episódios agudos de piora (surto). Na forma PP, observa-se uma progressão desde o início da doença, com períodos de agravamento e sem remissões. A maioria dos pacientes são refratários ao tratamento convencional e, por isso, há maior comprometimento da qualidade de vida. A EM-PP é a forma que mais se distingue das demais, sendo responsável por 10-15% dos casos de EM. Seu diagnóstico é mais difícil, já que não apresenta critérios clássicos de disseminação de lesões (Lublin *et al.*, 2014; Farjam *et al.*, 2015; Brownlee *et al.*, 2017).



**Figura 6. Descrição do curso clínico da EM para forma progressiva (1996 vs 2013).** Extraído de: *Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions* (número de licença para uso da imagem: 4174932335607; Copyright Clearance Center) (Lublin *et al.*, 2014).

Historicamente, o diagnóstico da EM sempre foi complexo, uma vez que as lesões no SNC eram observadas apenas por autópsia. Os primeiros critérios de diagnóstico para EM (Schumacher e Poser) foram publicados em 1965 e 1983, respectivamente (Schumacher *et al.*, 1965; Poser *et al.*, 1983) e, portanto, basearam-se em eventos diretamente observacionais: um

diagnóstico clínico definitivo de EM exigia, pelo menos, duas recidivas clínicas agudas. O critério de Poser também incorporou evidências de medições elétricas da atividade cerebral, quando certos nervos eram estimulados ("potencial evocado") e punção lombar para ajudar no diagnóstico clínico (Poser *et al.*, 1983).

Com o advento da MRI, tornou-se possível classificar os padrões de lesão no SNC que são sugestivos de EM. Quando a compreensão da MRI melhorou, os critérios diagnósticos de McDonald foram introduzidos em 2001 e aprimorados em 2005 e 2010 (McDonald *et al.*, 2001; Polman *et al.*, 2005; Polman *et al.*, 2011). Esses critérios permitem que o diagnóstico de EM possa ser feito em uma pessoa que teve apenas uma recaída, devido à incorporação das evidências pelo exame de MRI. Ressalta-se que a certeza diagnóstica pode ser aumentada quando as lesões são observadas em locais típicos e quando podem ser mostradas ao longo de um período de tempo (Montalban *et al.*, 2010). Como resultado da incorporação da MRI nos critérios diagnósticos, as pessoas com EM tiveram sua condição patológica mais rapidamente identificada, de forma mais sensível e consistente. O número de pessoas cuidadosamente diagnosticadas com EM dentro de 1 ano (desde a primeira recaída), mais do que triplicou, quando usados os critérios de McDonald em comparação aos critérios de Poser. Além disso, o diagnóstico pode ser estabelecido a partir das primeiras imagens de MRI, em cerca de uma a cada cinco pessoas que sofrem uma única recaída, empregando os critérios de McDonald de 2010 (**Tabela 2**) (Runia *et al.*, 2013).

Os critérios de McDonald são amplamente aceitos e utilizados para estabelecer o diagnóstico de EM. Dos 105 países participantes de uma pesquisa global em 2013, 92% relataram usar alguma das versões dos critérios de McDonald. A evidência mundial trazida pelos Estados Unidos mostra que o tempo médio desde o início dos sintomas até o diagnóstico caiu de 7,2 anos em 1980-1984, para 0,63 anos em 2000-2004 (MSIF, 2013a). No mesmo período de tempo, a proporção de pessoas com deficiência moderada ou grave (em oposição à incapacidade leve) em sua visita inicial a um profissional da saúde, caiu de mais de 50%, para cerca de 25% (Marrie *et al.*, 2005). O diagnóstico precoce significa tratamento precoce. Dessa forma, pode-se melhorar o prognóstico a longo prazo para pessoas com EM, e reduzir danos subsequentes ao SNC. Também é possível evitar novas recaídas clínicas desnecessárias ou progressão da incapacidade.

Os atrasos no diagnóstico da EM devem ser minimizados, pois estes podem resultar em progressão irreversível da deficiência. Com isso, listam-se algumas recomendações: (i) orientar o público em geral para tomar medidas rápidas se forem desenvolvidos os primeiros sintomas de EM, visitando um profissional de saúde; (ii) orientar os médicos de atenção básica sobre a

importância de encaminhar prontamente as pessoas com suspeita de EM para um neurologista; (iii) melhorar o acesso aos cuidados especializados para EM e; (iv) adotar os últimos critérios de diagnóstico aceitos (Giovannoni *et al.*, 2016).

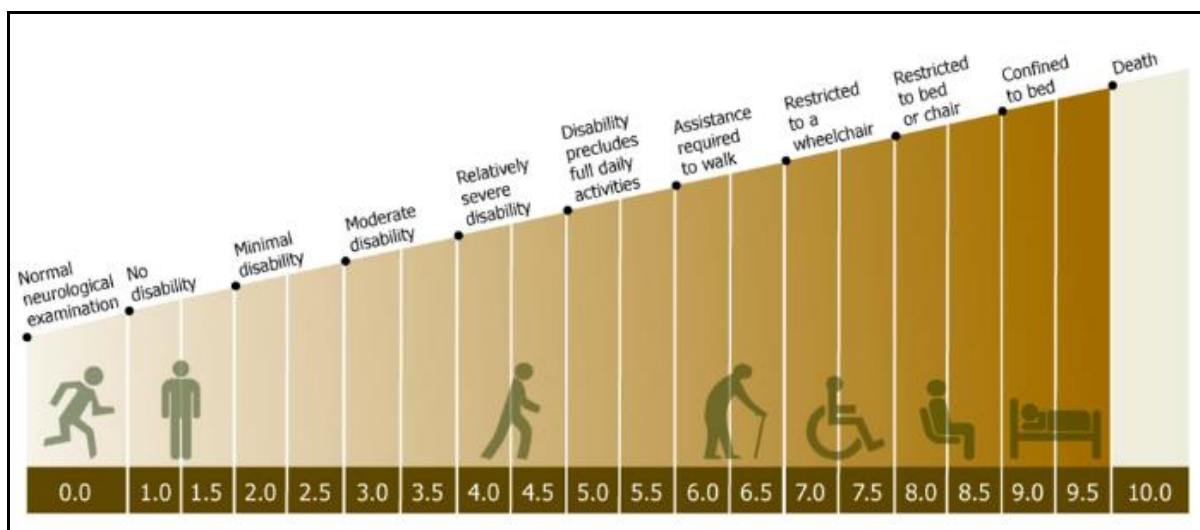
Clinical Presentation	Additional Data Needed for MS Diagnosis
≥2 attacks <sup>a</sup> ; objective clinical evidence of ≥2 lesions or objective clinical evidence of 1 lesion with reasonable historical evidence of a prior attack <sup>b</sup>	None <sup>c</sup>
≥2 attacks <sup>a</sup> ; objective clinical evidence of 1 lesion	Dissemination in space, demonstrated by: ≥1 T2 lesion in at least 2 of 4 MS-typical regions of the CNS (periventricular, juxtacortical, infratentorial, or spinal cord) <sup>d</sup> ; or Await a further clinical attack <sup>a</sup> implicating a different CNS site
1 attack <sup>a</sup> ; objective clinical evidence of ≥2 lesions	Dissemination in time, demonstrated by: Simultaneous presence of asymptomatic gadolinium-enhancing and nonenhancing lesions at any time; or A new T2 and/or gadolinium-enhancing lesion(s) on follow-up MRI, irrespective of its timing with reference to a baseline scan; or Await a second clinical attack <sup>a</sup>
1 attack <sup>a</sup> ; objective clinical evidence of 1 lesion (clinically isolated syndrome)	Dissemination in space and time, demonstrated by: For DIS: ≥1 T2 lesion in at least 2 of 4 MS-typical regions of the CNS (periventricular, juxtacortical, infratentorial, or spinal cord) <sup>d</sup> ; or Await a second clinical attack <sup>a</sup> implicating a different CNS site; and For DIT: Simultaneous presence of asymptomatic gadolinium-enhancing and nonenhancing lesions at any time; or A new T2 and/or gadolinium-enhancing lesion(s) on follow-up MRI, irrespective of its timing with reference to a baseline scan; or Await a second clinical attack <sup>a</sup>
Insidious neurological progression suggestive of MS (PPMS)	1 year of disease progression (retrospectively or prospectively determined) plus 2 of 3 of the following criteria <sup>d</sup> : 1. Evidence for DIS in the brain based on ≥1 T2 lesions in the MS-characteristic (periventricular, juxtacortical, or infratentorial) regions 2. Evidence for DIS in the spinal cord based on ≥2 T2 lesions in the cord 3. Positive CSF (isoelectric focusing evidence of oligoclonal bands and/or elevated IgG index)

**Tabela 2. Os critérios de McDonald para diagnóstico da EM.** MS, esclerose múltipla; CNS, sistema nervoso central; MRI, ressonância magnética por imagem; DIS, disseminação no espaço; DIT; disseminação no tempo; PPMS, esclerose múltipla primária progressiva; CSF, líquido cefalorraquidiano, IgG, imunoglobulina G. Extraído de: *Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria* (número de licença para uso da imagem: 4174940344615; *Copyright Clearance Center*) (Polman *et al.*, 2011).

Em referência à determinação dos déficits funcionais, a escala da avaliação funcional de uso mais difundido é a EDSS (*Expanded Disability Status Scale of Kurtzke*) (Kurtzke, 1983) (**Figura 7**), que avalia principalmente a capacidade de deambulação, entre outros parâmetros. A escala apresenta graduação variando de 0 a 10: alterações neurológicas funcionais, incluindo as dos sistemas piramidal, cerebelar, tronco cerebral, cognitivo e sensorial são graduadas, bem como, as funções vesical, intestinal e visual. A função de cada um desses sistemas recebe graduação de 0 a 6. Uma graduação global de zero indica exame neurológico normal. Pacientes com escores de 1,0 a 3,0 têm incapacidade moderada, significando déficit discreto a moderado

do sistema funcional. Os pacientes com escores de 3,5 a 5,5 têm boa capacidade de deambular sem apoio, necessitam alguma assistência, apresentando limitações progressivas quando precisam percorrer grandes distâncias. Exemplificando, o escore 4,0 refere-se à incapacidade de deambulação acima de 500 metros; o escore 5,5 a mais de 100 metros. O paciente com escore 6,0 precisa de apoio com bengala, muleta ou outros suportes. Escores de 6,5 a 7,0 correspondem a pacientes que não deambulam, ficando restritos à cadeira de rodas. No entanto, conseguem se transferir da cadeira para a cama, com ou sem auxílio. Os pacientes restritos ao leito, que não conseguem se transferir da ou, para a cadeira de rodas, são graduados com escore 8,0. O paciente com escore 8,5 e 9,0 fica restrito ao leito e, não consegue se comunicar ou se alimentar. A morte causada por EM corresponde ao escore 10 (Cohen *et al.*, 2012).

A avaliação do LCR, através da pesquisa de bandas oligoclonais, é outro exame para auxiliar o diagnóstico da doença. Importante salientar que não consiste em um exame de indício exclusivo, pois outras patologias como neurosífilis e encefalopatias virais, causadas por HIV, também podem apresentar bandas oligoclonais (Matas *et al.*, 2013).



**Figura 7. Escala expandida do estado de incapacidade de Kurtzke.** Extraído de: <http://www.msunites.com> (autorização para uso da imagem: ©Multiple Sclerosis News Network). Data de acesso: 23/08/17.

Atualmente, não existe cura para EM, sendo que o tratamento empregado promove apenas atenuação dos sintomas e estabilização ou retardamento da progressão da doença. O tratamento recomendado para os surtos, que consistem em novos sintomas neurológicos focais, com duração maior que 24 horas e precedendo um período de estabilidade clínica de no mínimo 30 dias, é realizado pela administração de glicocorticoides em altas doses. Usualmente, prescreve-se 500 a 1000 mg ao dia de metilprednisolona, por 3 a 7 dias (Goodin, 2014). Esse esquema pode ser seguido ou não pela administração de corticoides orais, em doses

decrecentes, por 21 dias. Todavia, não há evidências conclusivas sobre o uso correto uso dessas doses decrescentes (Goodin, 2014).

A EM-RR requer a utilização de imunomoduladores. Estes, por sua vez, são fármacos que regulam a resposta imunológica sem interferir na produção e na destruição dos linfócitos. Os IFNs são sintetizados por organismos vivos: IFN- $\beta$  1b, extraído de *E. coli* e, IFN- $\beta$  1a, obtido de ovário de hamsters ou de fibroblastos humanos. São utilizados para o tratamento de várias patologias, como hepatites e neoplasias. Seu mecanismo de ação está relacionado à diminuição da resposta inflamatória do tipo Th1 e Th17, que está aumentada em pacientes com EM. Importante destacar que o IFN- $\beta$  1b foi o primeiro fármaco capaz de demonstrar efeitos benéficos na evolução clínica de pacientes com EM-RR, mostrando redução na frequência e intensidade dos surtos e diminuição das lesões na imagem por MRI (Reder *et al.*, 2014). O acetato de glatirâmer é um polipeptídeo composto principalmente por ácido glutâmico, lisina, alanina e tirosina, possuindo uma composição semelhante à MBP. O mecanismo imunomodulatório não está totalmente esclarecido e, sobretudo, é complexo, principalmente, por regular as respostas imunes inata e adaptativa. Suas ações envolvem a alteração de função das células Tregs, induzindo a mudança do fenótipo Th1 para Th2, ou seja, um perfil de citocinas anti-inflamatórias, bem como, uma armadilha para a resposta autoimune, já que se assemelha aos componentes da bainha de mielina. Modula, também, as células apresentadoras de antígenos (APC) e as células B (Anderson *et al.*, 2015). O estudo pioneiro com acetato de glatirâmer comparou o uso de 20 mg do fármaco com placebo, em pacientes com EM-RR, e teve como desfecho primário a redução da frequência de recidivas. Após dois anos de estudo, a taxa de recidivas e o tempo para a primeira recidiva foi menor em pacientes que fizeram uso do fármaco, assim como, houve diminuição do número de lesões com captação de gadolínio (Comi *et al.*, 2009).

Os medicamentos imunomoduladores apresentam uma eficácia relativamente limitada, em particular, nos pacientes com formas clínicas mais agressivas e/ou progressivas. Nesse cenário, algumas terapias imunossupressoras mostraram eficácia em grupos seletos de pacientes tendo, em contrapartida, uso restrito em vista de seus perfis de risco e efeitos adversos (Cohen *et al.*, 2010b; Dolati *et al.*, 2017). Ademais, para que ocorra o processo de remielinização axonal, são necessários baixos níveis de inflamação, justamente para que haja recrutamento de fatores de crescimento para o neurônio. Isso poderia explicar, em parte, o insucesso da terapia imunossupressora. (Bramow *et al.*, 2010). Dentre os exemplos de imunossupressores estão: metotrexato, ciclofosfamida, azatioprina, mitoxantrona e fingolimode. Esse último foi o primeiro fármaco, de uso por via oral, para EM-RR, aprovado em 2010 pelo *Food and Drug*

*Administration* (FDA). O fingolimode é um modulador dos receptores de esfingosina 1-fosfato (S1PR). O seu mecanismo de ação principal decorre da retenção de determinados subgrupos de linfócitos nos linfonodos. As células CCR7 positivas, como os linfócitos *naïve*, são impedidos de sair dos linfonodos e, por conseguinte, não migram para o SNC, reduzindo, assim, a resposta autoimune. Após dois ensaios clínicos de fase III, o fármaco foi aprovado em vários países, na dose de 0,5 mg, via oral, uma vez ao dia (Cohen *et al.*, 2010a; Kappos *et al.*, 2010). No Brasil, possivelmente, até novembro de 2017, deve chegar ao Sistema Único de Saúde outro fármaco administrado por via oral, para o tratamento da forma clínica EM-RR, a teriflunomida. Todavia, o custo mensal para o governo brasileiro deverá ser de R\$ 6.000 a R\$ 7.500 por paciente (Anvisa, 2017).

Os anticorpos monoclonais (AcMs) são outra importante opção terapêutica para o tratamento da EM. Estes também possuem efeitos imunomoduladores limitados, principalmente, devido à produção de anticorpos neutralizantes, além do custo altíssimo. Os principais AcMs aprovados pelo FDA para uso na EM são: alentuzumabe (anti-CD52), daclizumabe (anti-CD56), ocrelizumabe (anti-CD20) e natalizumabe. Dentre estes, o natalizumabe, AcM do tipo humanizado, é o único aprovado para o tratamento da EM-SP (Shirani *et al.*, 2016). O natalizumabe é um antagonista de integrina  $\alpha 4$ , expressa na superfície de leucócitos. A integrina  $\alpha 4$  possui um papel essencial na migração leucocitária, através da barreira hematoencefálica para o SNC, sendo esta uma etapa importante no desenvolvimento de lesões inflamatórias na EM. Estudos demonstraram que este AcM reduz a taxa de surtos e a taxa de progressão da incapacidade neurológica (mensurado pelo EDSS). Na MRI do encéfalo, observa-se a diminuição de lesões captantes de gadolínio (Goodin *et al.*, 2008). O ocrelizumabe foi aprovado pelo FDA, neste ano, no primeiro semestre de 2017 com indicação para as formas EM-RR e EM-PP (Mullard, 2017).

Nos últimos anos, o repertório de terapias modificadoras da doença (DMTs) para EM ampliou acentuadamente, oferecendo soluções mais eficientes e mais adequadas para os pacientes. No entanto, o risco de infecção associado a esses fármacos tem ganhado importância ao planejar tratamentos e monitorar pacientes. Os dados atuais sugerem que o risco de desenvolver infecções pode aumentar com a duração do tratamento da EM. A experiência com natalizumabe (principalmente), fumarato de dimetila e fingolimode indicam num maior risco de desenvolver leucoencefalopatia multifocal progressiva, uma infecção causada pela reativação do vírus latente JC devido à profundas imunossupressões, e que geralmente é fatal, além de outras doenças infecciosas oportunistas (Winkelmann *et al.*, 2016). Adicionalmente, pacientes relatam que o comprometimento da mobilidade é um dos piores aspectos da EM, e

quase metade dos indivíduos, quando tratados com DTMs, não têm melhora desse sintoma (Berger, 2011; Kang *et al.*, 2016).

Segundo a portaria nº 391, de 5 de maio de 2015 do Ministério da Saúde o IFN- $\beta$  é o fármaco de referência para o tratamento da EM. Em casos de pacientes com EM-RR refratários a IFN- $\beta$ , preconiza-se trocar por acetato de glatirâmer, porque há uma grande taxa de produção de anticorpos neutralizantes que reduzem a eficácia dos IFNs. A recomendação do uso de natalizumabe deve ocorrer somente após ter sido tentado o uso de IFNs e acetato de glatirâmer. Por último, devido, sobretudo, aos potenciais efeitos adversos cardiovasculares relacionados à primeira dose de fingolimode, recomenda-se o uso apenas em casos incapacitantes após o uso de IFN- $\beta$  e de acetato de glatirâmer, sem contraindicação ao uso de fingolimode e com contraindicação ao uso de natalizumabe (Ministério da Saúde: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla, 2015). Em contrapartida, essa linearidade do protocolo de tratamento da EM é extremamente discutida entre os neurologistas.

Em casos extremos de EM pode ser realizado o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas. O procedimento é conduzido em âmbito hospitalar, havendo risco de infecções graves e hemorragia, além do custo extremamente elevado (Sormani *et al.*, 2017).

#### 1.4 Modelo animal de encefalomielite autoimune experimental

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) foi descoberta há cerca de 90 anos, durante os esforços para esclarecer a origem do "acidente neurológico", uma complicação temida e comum durante a vacinação contra o vírus da raiva. O inóculo da vacina foi preparado em tecidos que continham elementos neurais, e a patologia tecidual de casos fatais não se assemelhava com a infecção por raiva. Portanto, uma questão simples levantada pelos médicos foi se o vírus era necessário para o desenvolvimento desse "acidente". A questão foi esclarecida através da injeção do homogenato tecidual, semelhante ao usado para vacina da raiva, em primatas não humanos, levando à descrição da encefalite aguda experimental produzida pela imunização (Croxford *et al.*, 2011).

Na atualidade, o modelo animal mais estudado e conhecido como padrão ouro para estudo da EM é a EAE. A EAE em camundongos foi induzida pela primeira vez há mais de 60 anos por imunização através de homogenatos de medula espinhal (Olitsky *et al.*, 1949). Extensas pesquisas levaram à descoberta de diversos peptídeos encefalitogênicos (componentes da bainha de mielina), que desencadeiam sintomas clássicos da EM (Rangachari *et al.*, 2013). A EAE também se tornou um modelo muito bem caracterizado para doenças autoimunes órgão-específico. De fato, diversos estudos foram publicados mostrando a validação do modelo *in*

*vivo*. Os exemplos incluem a descoberta de ROR- $\gamma$  (RORC) como um fator de transcrição chave para o desenvolvimento de células Th17 (Ivanov *et al.*, 2006); a identificação do receptor de hidrocarbonetos de arila como componente essencial no desenvolvimento das respostas Tregs e Th17 (Veldhoen *et al.*, 2008); e a função da IL-12 e IL-23 na susceptibilidade à desmielinização autoimune (Cua *et al.*, 2003).

Os camundongos continuam sendo a espécie animal mais comumente utilizada, em parte, devido à ampla disponibilidade de camundongos transgênicos e *knockout* para estudos de sinalização celular e molecular da doença (Robinson *et al.*, 2014). Em camundongos SJL, a EAE pode ser induzida por imunização com homogenatos do SNC: PLP, MBP, epítomos encefalitogênicos de PLP (PLP<sub>139-151</sub>, PLP<sub>178-191</sub>), MOG<sub>92-106</sub>, ou MBP<sub>84-104</sub> em uma emulsão com adjuvante completo de Freund (CFA), que por sua vez, possui atividade imunogênica. A doença segue um curso clínico previsível, caracterizado por um período prodrômico (intervalo de tempo entre os primeiros sintomas) de 10-15 dias, seguido de paralisia ascendente, começando na cauda e membros posteriores, progredindo para os membros anteriores, com perda de peso (Constantinescu *et al.*, 2011). Nos camundongos SJL, a doença é caracterizada por um curso remitente-recorrente de paralisia, permitindo estudos de estratégias imunomoduladoras em situação de doença autoimune recidivante (Robinson *et al.*, 2014).

O MOG<sub>35-55</sub> é um agente encefalitogênico potente em camundongos C57BL/6. Representa o modelo mais refinado para análise do processo imunopatogênico, bem como, do curso crônico da EM. Além disso, um estudo recente *in vitro* e *in vivo* mostrou que o antígeno MOG<sub>35-55</sub> possui maior auto-reatividade aos linfócitos T, quando comparado com os epítomos PLP<sub>139-151</sub>, PLP<sub>178-191</sub> ou MBP<sub>84-104</sub> (Traka *et al.*, 2016).

Por outro lado, existe a EAE passiva ou *adoptive-transfer* EAE, que pode ser induzida em camundongos através da transferência de células T CD4<sup>+</sup> mielina-específico, estas por sua vez, geradas pela imunização ativa de camundongos doadores (Stromnes *et al.*, 2006). Esse tipo de EAE foi fundamental para estabelecer o papel das células T reativas à mielina na patogênese da doença. A EAE passiva permitiu aos pesquisadores se concentrar em variáveis associadas à "fase efetora" da doença e "ignorar" a fase de indução. As células T encefalitogênicas também podem ser manipuladas *in vitro* para caracterizar o papel de citocinas específicas e outros agentes biológicos, antes da transferência das células T, para os camundongos receptores. Essas células podem ser marcadas com o objetivo de verificar a localização, sobrevivência e interação com outros tipos celulares, no camundongo receptor (Constantinescu *et al.*, 2011).

Nos pacientes não se sabe ao certo como se inicia e quais são os antígenos-alvo da doença. Células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, células B e anticorpos, células *natural killer* (NK),



macrófagos, moléculas do complemento, citocinas e quimiocinas participam na patogênese (Sospedra *et al.*, 2005). O conjunto de evidências mais estudado envolve a participação das células T CD4<sup>+</sup>. Essas estão presentes no infiltrado inflamatório do SNC e no LCR, sendo que a EAE pode ser induzida em camundongos através da injeção de células T CD4<sup>+</sup> reativas à MOG, MBP e PLP (Dutra *et al.*, 2013; Rangachari *et al.*, 2013).

A pesquisa translacional refere-se ao desenvolvimento ou translação de novos conhecimentos e descobertas no laboratório, em produtos que serão aplicados aos pacientes. Desta forma, em diversos casos, o novo conhecimento obtido com o modelo de EAE foi traduzido com sucesso em tratamentos efetivos para pacientes com EM, como por exemplo: fingolimode, IFN- $\beta$ , assim como o natalizumabe (Lopez-Diego *et al.*, 2008). Cabe ponderar que ainda existe uma lacuna, significativa, entre o sistema imune de camundongos e dos humanos. Com isso houve insucessos terapêuticos na translação: *ustekinumab* (anti-IL-12/IL23) e terapias biológicas com alvo em células B (t Hart *et al.*, 2014).

Em suma, os modelos animais são particularmente relevantes para obter informações sobre a segurança, eficácia, farmacocinética e/ou farmacodinâmica do fármaco-candidato.

### 1.5 *Phoneutria nigriventer* e canais de cálcio voltagem-dependentes

Os venenos de aranhas, caramujos, cobras, vespas e escorpiões são uma rica fonte para o desenvolvimento de fármacos, já que contêm peptídeos que modulam receptores e canais iônicos (Lewis *et al.*, 2003; Kularatne *et al.*, 2014). Em especial, as aranhas são um grupo antigo e bem-sucedido de animais invertebrados, amplamente, distribuído em todo o mundo. Possuem lugar marcante nos mitos populares e no folclore, devido a seus hábitos secretos, aspecto físico e comportamento predatório. Embora exista uma imensa diversidade (cerca de 40.000 espécies descritas e, provavelmente, mais de 100.000 não descritas), poucas espécies são relevantes para a saúde humana (Isbister *et al.*, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde, os gêneros clinicamente importantes de aranhas são *Phoneutria*, *Latrodectus*, *Loxosceles* (Araneomorphae) e *Atrax* (Mygalomorphae). No Brasil, as aranhas perigosas pertencem aos gêneros *Phoneutria*, *Loxosceles* e *Latrodectus*, compreendendo cerca de 20 espécies. Dentro do gênero *Phoneutria*, as espécies de maior relevância clínica são: *Phoneutria fera*, *Phoneutria reidyi*, *Phoneutria keyserlingi* e *Phoneutria nigriventer* (Farsky *et al.*, 2005).

O gênero *Phoneutria* pertence à família da *Ctenidae*, presente na América do Sul e Costa Rica. No entanto, a maioria dos relatos de acidentes clinicamente relevantes são no Brasil (Bucarechi *et al.*, 2000; Bucarechi *et al.*, 2008). Em particular, a espécie *P. nigriventer* é conhecida popularmente como aranha armadeira, pela posição que toma ao se sentir ameaçada.

Possui hábitos noturnos e permanece refugiada durante o dia. No período de acasalamento, esta espécie pode atingir o intradomicílio, quando os machos se tornam mais ativos à procura das fêmeas, acentuando-se os riscos de acidentes. A aranha *P. nigriventer* não constrói teia e seu sucesso como predadora pode ser explicado pela potência das diversas toxinas presentes em seu veneno (Gomez *et al.*, 2002). Os sintomas de envenenamento em animais e seres humanos após acidentes com a armadeira incluem dor intensa e irradiada, salivação, perturbações visuais, sudorese, priapismo, arritmias cardíacas, taquicardia, convulsões tônicas e paralisia espástica, podendo evoluir para a morte. Alguns destes sintomas são causados por ações centrais e periféricas, como consequência da liberação maciça de neurotransmissores em terminações nervosas autonômicas e motoras (Lucas, 1988; Farsky *et al.*, 2005; Raposo *et al.*, 2016).

Os peptídeos produzidos pela glândula da aranha *P. nigriventer* têm sido extensivamente investigados, sendo descritos 17 peptídeos ativos que atuam principalmente no funcionamento de canais de sódio, cálcio, potássio, assim como em receptores do sistema nervoso (Grishin, 1999; Gomez *et al.*, 2002). Além disso, os peptídeos têm peso molecular que varia de 3,5 a 9 kDa (Gomez *et al.*, 2002).

Os primeiros estudos com os peptídeos revelaram um potente efeito neurotóxico, uma das principais características do veneno da *P. nigriventer*. O efeito foi atribuído a uma ação sobre os canais de sódio voltagem-dependentes, através da indução de potenciais de ação repetidos, em terminações nervosas e membranas de fibras musculares (Fontana *et al.*, 1985). Não obstante, foram encontradas outras atividades farmacológicas distintas relacionadas ao veneno e, conseqüentemente, aos canais iônicos. Particularmente, isso foi possível devido ao fracionamento do veneno total (Diniz *et al.*, 1990). Com isso, alguns estudos conseguiram demonstrar que frações do veneno, quando administradas por via intracerebroventricular, produziram paralisia flácida. Portanto, um segundo efeito farmacológico do veneno foi estabelecido, ou seja, uma atividade bloqueadora dos canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) (Gomez *et al.*, 1995; Prado *et al.*, 1996; Leao *et al.*, 2000).

Os CCVD são uma família de canais iônicos classificados por propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas. O primeiro complexo de CCVD foi estudado no músculo esquelético, onde está presente em grande abundância nos túbulos transversais. Após a purificação do complexo, verificou-se que contém cinco componentes:  $\alpha 1$  (~170 kDa),  $\alpha 2$  (~150 kDa),  $\beta$  (~52 kDa),  $\delta$  (~17-25 kDa) e  $\gamma$  (~32 kDa) (Takahashi *et al.*, 1987). E podem ser divididos em canais de baixo limiar de ativação (subtipo T) e de alto limiar (subtipos L, N, P/Q e R) (**Tabela 3 e Figura 8**) (Zamponi, 2016). Além disso, a contribuição dos diferentes CCVD

para processos nociceptivos e inflamatórios ganharam considerável interesse nos últimos anos (Stokes *et al.*, 2016; Zamponi, 2016).

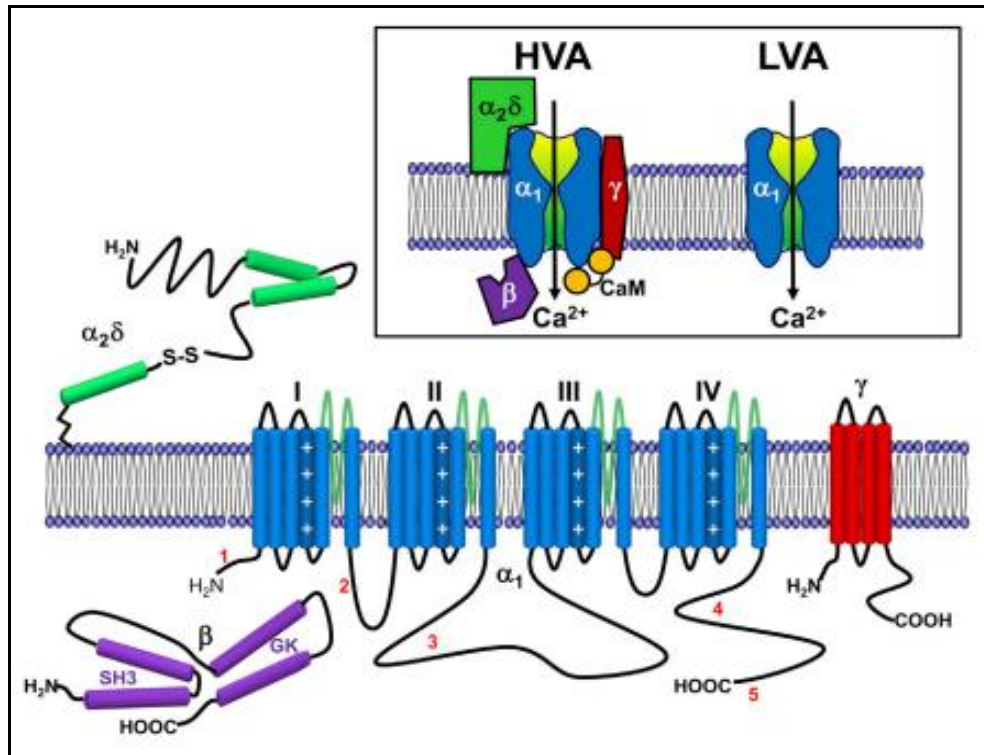
De fato, sua atividade modulatória nas respostas nociceptivas em áreas como a medula espinhal, gânglios da raiz dorsal e do tronco cerebral, indicam o papel essencial destes CCVD no processamento de informações nociceptivas para o sistema nervoso central (Heinke *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2004). Ademais, os CCVD parecem estar implicados na sensibilização da dor central que ocorre em nervos lesionados e durante os estados inflamatórios (Matthews *et al.*, 2001; Matthews *et al.*, 2007). Em modelos animais de lesão nervosa foi visto que o bloqueio dos CCVD do subtipo N e P/Q reduziu os sinais comportamentais de nocicepção de origem neuropática (Matthews *et al.*, 2001). Os CCVD do subtipo N estão presentes no terminal pré-sináptico de neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal, regulando dessa forma, a liberação de neurotransmissores pró-nociceptivos como glutamato e substância P. (Wen *et al.*, 2005). Adicionalmente, o aumento da concentração de cálcio intracelular faz com que haja a translocação do fator nuclear de células T ativadas para o núcleo e, com isso, a inicialização da transcrição, resultando na secreção de citocinas e na proliferação de células T (Bradding *et al.*, 2009).

VOLTAGE-ACTIVATED CHARACTERISTICS	FAMILY DESIGNATION	SUBUNIT DESIGNATION	CHANNEL DESIGNATION
High-voltage activated channels	Ca <sub>v</sub> 1	Ca <sub>v</sub> 1.1 α1S	L
		Ca <sub>v</sub> 1.2 α1C	L
		Ca <sub>v</sub> 1.3 α1D	L
		Ca <sub>v</sub> 1.4 α1F	?
	Ca <sub>v</sub> 2	Ca <sub>v</sub> 2.1 α1A	P/Q
		Ca <sub>v</sub> 2.2 α1B	N
		Ca <sub>v</sub> 2.3 α1E	R
Low-voltage activated channels	Ca <sub>v</sub> 3	Ca <sub>v</sub> 3.1 α1G	T
		Ca <sub>v</sub> 3.2 α1H	T
		Ca <sub>v</sub> 3.3 α1I	T

**Tabela 3. Classificação dos canais de cálcio voltagem-dependentes pela subunidade α1.** Extraído de: *Calcium Channels As Therapeutic Targets in Neuropathic Pain* (número de licença para uso da imagem: 4175491117587; Copyright Clearance Center) (Yaksh, 2006).

Logo após a caracterização farmacológica inicial do veneno da *P. nigriventer*, foram descritas as primeiras frações do veneno: Phoneutriatoxina-1 (PhTx1) e Phoneutriatoxina-2 (PhTx2) (**Tabela 4**), as quais causavam contração do íleo de cobaias (Rezende Junior *et al.*, 1991). Posteriormente, outra fração proteica foi isolada e estudada, a Phoneutriatoxina-3 (PhTx3). Essa fração, quando injetada em roedores, induziu paralisia flácida (Rezende Junior *et al.*, 1991) que ocorreu, provavelmente, devido à sua ação inibitória sobre a liberação de

neurotransmissores (Gomez *et al.*, 1995; Prado *et al.*, 1996). A partir da fração PhTx3, seis diferentes isoformas foram purificadas (Tx3-1 a Tx3-6) (Cordeiro Mdo *et al.*, 1993) e, pelo menos três delas (Tx3-3, Tx3-4 e Tx3-6) bloqueiam o influxo de cálcio induzido por despolarização com altas concentrações de KCl, nas terminações nervosas (Prado *et al.*, 1996; Guatimosim *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 1998).



**Figura 8. Topologia transmembrana e composição das subunidades dos canais de cálcio dependentes de voltagem.** HVA, alto limiar de ativação; LVA, baixo limiar de ativação. Extraído de: *Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction* (número de licença para uso da imagem: 4175490161441; Copyright Clearance Center) (Simms *et al.*, 2014).

Em 2006, a isoforma Tx3-6 (**Tabela 4**) que foi patenteada e então denominada Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , apresentou-se efetiva em bloquear, preferencialmente, os CCVD do subtipo N (Vieira *et al.*, 2005). Mais recente, a forma nativa da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  foi produzida através da técnica de DNA recombinante pela empresa Giotto Biotech (Florença, Itália), sendo renomeada como CTK 01512-2 (55 aminoácidos, 6 ligações dissulfeto). Ademais, pesquisas demonstraram que a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  é tão potente quanto a  $\omega$ -conotoxina MVIIA, quanto ao efeito antinociceptivo, apresentando índice terapêutico maior do que a  $\omega$ -conotoxina MVIIA, em experimentos pré-clínicos (Souza *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2011). Cabe ressaltar que a versão sintética do peptídeo  $\omega$ -conotoxina MVIIA, extraída do caramujo *Conus magus*, é a ziconotida, um medicamento aprovado (Nome comercial: Prial; Azur Pharma International, Filadélfia, EUA) para o tratamento da dor em pacientes que necessitam de analgesia intratecal e são refratários à

terapia opioide. Este agente analgésico se mostrou eficaz no tratamento de dor severa e crônica por bloquear os CCVD do subtipo N da medula espinal (McGivern, 2007).

Toxin	MW (Da)	Signal peptide	propeptide	Mature toxin	C-terminal Extra residues	Reference
Tx2-1	5851.27	17	17	53	1	Kalaothakis et al., 1998a Cordeiro et al., 1992
Tx2-1 ACCESSION NCBI P29423: MKVAILLSILVLAVAS / ETIEEYRDDFAVEELER / ATCAGQDKPKETCDCCGERGECVCAISYEGKYRCICROGNFLIAWHKLASCK / K						
Pn2-1A	6079.53	17	44	54	?	Kalaothakis et al., 1998a
Pn2-1A ACCESSION NCBI O76198: MKVAVIISILVLAAAS / ESIEEYREDFSRPNAMERSANDWIPTAPSAVERSADFAVEELER / ATCAGQDKPKETCDCCGERGECVCAISYEGKYRCICROGYVWIAWYKLASCK / K						
Tx2-5	5110.53 <sup>A</sup>	-	-	49 <sup>D</sup>	-	Cordeiro et al., 1992
Tx2-5 ACCESSION NCBI P29424: ATCAGQDQTKVTCDCGERGECVCGGPCICROGNFLIAAYKLASCKCK						
Pn2-5A	5122.55	17	17	48 <sup>D</sup>	?	Kalaothakis et al., 1998a
Pn2-5A ACCESSION NCBI O76199: MKVAILFLSILVLAVAS / ESIEESRDDFAVEELGR / ATCAGQDQTKVTCDCGERGECVCGGPCICROGNFLIAWYKLASCK						
Tx2-6	5297.71	17	17	48	-	Matavel et al., 2002 Cordeiro et al., 1992
Tx2-6 ACCESSION NCBI P29425: MKVAILFLSILVLAVAS / ESIEESRDDFAVEELGR / ATCAGQDQPKETCDCCGERGECVCGGPCICROGYFWIAWYKLANCK						
Tx2-9	3742.10 <sup>A</sup>	-	-	-	-	Cordeiro et al., 1992
Tx2-9 ACCESSION NCBI P29426: SFCIPFKPKSDENCKKFKCKTTGIVKLCRW						
Tx3-1	4582.93	21	16	40	6	Kushmerick et al., 1999 Cordeiro et al., 1993
Tx3-1 ACCESSION NCBI O76200: MWFKIQVLLVLAITLTLGIQA / EPNSSPNNPLIVEEDR / AECAAVYERCGKGYKRCCEERPCKCNIVMDNCTCKKFISE / LFGFGK						
Tx3-2	3540.84	21	16	34	11	Kalaothakis et al., 1998b
Tx3-2 ACCESSION NCBI O76201: MWLKIQVLLVLAITLTLGIQA / EPNSSPNNPLIEEAR / ACAGLYKCKGKASPCEDRPKCDLAMGNCK / KKFIEFFGGGK						
Tx3-3	6300.00 <sup>B</sup>	-	-	-	-	Cordeiro et al., 1993
Tx3-3 ACCESSION NCBI P81789: GCANAYKSCNGPHTCCWGYNGYKACICSOXNWK <sup>C</sup>						
Tx3-4	8449.60 <sup>A</sup>	-	-	-	-	Cordeiro et al., 1993
Tx3-4 ACCESSION NCBI P81790: SCINVGDFCDGKDCQCDRDNAFCSVIFGYKTNCRC <sup>C</sup>						
Tx3-5	5063.6 <sup>A</sup>	-	-	-	-	Cordeiro et al., 1993
Tx3-5 ACCESSION NCBI P81791: GCIGNESCKFRHGCCWPWSCSCWNKEGQPESDVW <sup>C</sup>						
Tx3-6	6044.39	-	-	-	-	Cordeiro et al., 1993
Tx3-6 ACCESSION NCBI P81792: ACIPRGEICTDDBCCGCDNQCYPGSSLGIFKCSAHANKYFCNRKKECKKA						
Pn3A	4866.29	21	16	43 <sup>D</sup>	?	Kalaothakis et al., 1998b
Pn3A ACCESSION NCBI P81793: MWLKIQVFLVLAALITLGIQA / EPNSGPNPLIQEAR / ACADVYKECWYEPKPCCKDRACQCTLGMTCKKATLGLDFGRR						
Tx1	8669.17	18	15	77	2	Diniz et al., 1993
Tx1 ACCESSION NCBI A47130: MKLLGIFLVASFVLSF / GEEMIEGENPLEDQR / AELTSCFPVGHEDGDASNCNCGDDVYCGCGWRWNCKCKVADQSYAYGICKDKVNCNPNRHLWPAKVCKKPCRRN C / GG						
Tx4(6-1)	5250.55	16	18	48	-	Penaforte et al., 2000 Figueiredo et al., 1995
Tx4(6-1) ACCESSION NCBI 2108421: MKVAIVFLSLLVLAFA / SESIEENREEFPVEESAR / CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSKCREAAIIVYAPKKKLT						
Pn4A	5184.43	16	18	47	-	Penaforte et al., 2000 Figueiredo et al., 2001
Pn4A: MKVAIVFLSLLVLAFA / SESIEENREEFPVEESAR / CADINGACKSDCCGDSVTDCYWSKSKRESNFKIGMAIRKKFC						
Pn4B	5625.03	16	18	51 <sup>D</sup>	-	Penaforte et al., 2000
Pn4B: MKVAIVFLSLLVLAFA / SESIEENREEFPVEESAR / CGDINAPCQSDCCGYSVTDCYWSKSKRESLFLPGMALRKAFCQNKI						

**Tabela 4. Peptídeos isolados do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*.** Extraído de: *Phoneutria nigriventer Venom: A Cocktail of Toxins that Affect Ion Channels* (número de licença para uso da imagem: 4180331481623; Copyright Clearance Center) (Gomez et al., 2002).

Em 2014, Rosa e colaboradores mostraram que uma única injeção intratecal (i.t.) de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (30 ou 100 pmoles/sítio) reduziu a nocicepção neuropática, entre 1 e 6 horas após a administração do peptídeo, sem mostrar efeitos adversos detectáveis. Da mesma forma, a infusão contínua de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (60 pmoles/ $\mu$ L/h durante 7 dias) também foi capaz de reverter a nocicepção induzida pela lesão do nervo ciático, de 1 a 7 dias, e não causou efeitos adversos comportamentais ou alterações histopatológicas no SNC (Rosa et al., 2014). Adicionalmente

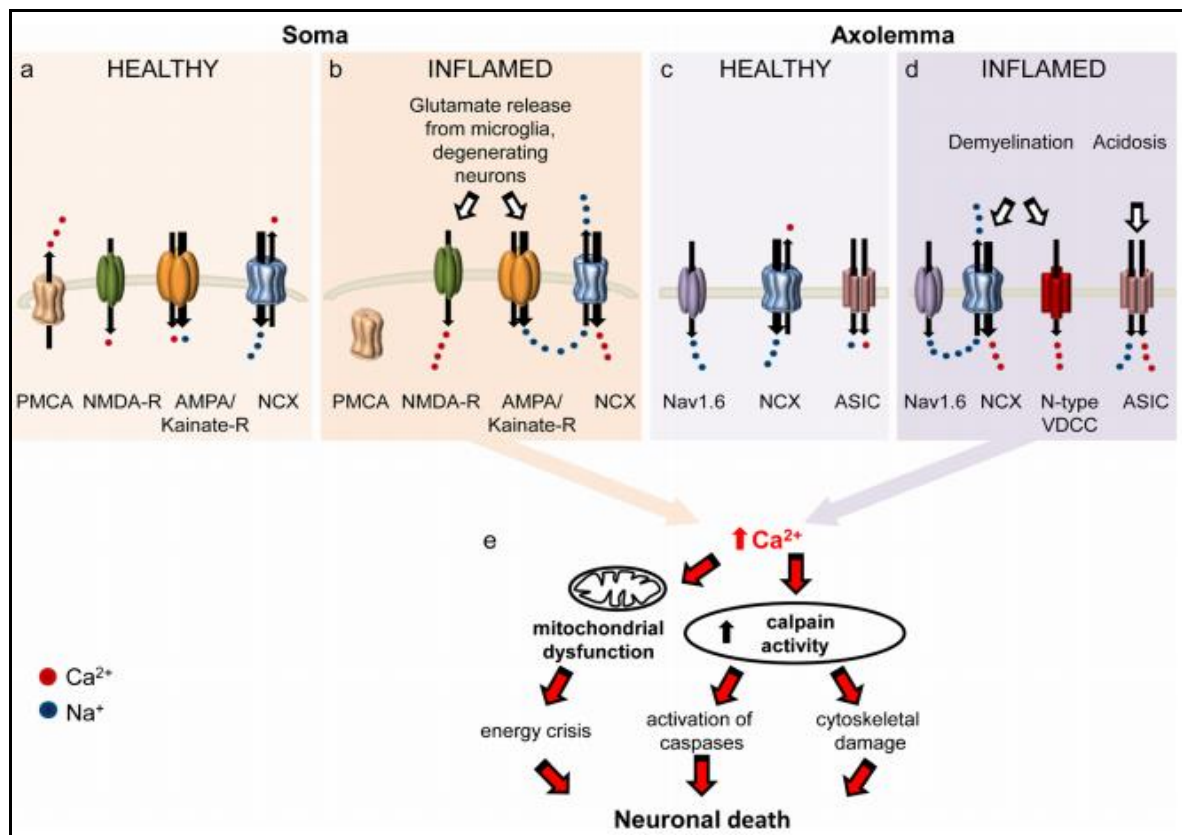
aos efeitos antinociceptivos na dor neuropática, Rigo e colaboradores mostraram, um ano antes, que o peptídeo Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (10-100 pmoles/sítio, i.t.) produziu resposta antinocicpetiva semelhante à  $\omega$ -conotoxina MVIIA, em modelo animal animal de câncer induzido pela inoculação de células de melanoma B16-F10, em camundongos C57BL/6, sem produzir efeitos colaterais graves (Rigo *et al.*, 2013).

Um estudo de 2017 revelou que a toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  potencializou em 15 vezes a ação antinociceptiva do bloqueador seletivo de receptores de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1), SB366791, no modelo de dor aguda induzida por capsaicina (Palhares *et al.*, 2017). Em contrapartida, também foi observado que a toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  e a forma recombinante, CTK 01512-2, inibiram seletivamente o influxo de cálcio e as correntes elétricas evocadas pelo agonista de TRP anquirina 1 (TRPA1), isotiocianato de alila, em células HEK293 que expressavam o TRPA1 humano, em fibroblastos fetais humanos (IMR90) e, em neurônios do gânglio da raiz dorsal. O peptídeo Ph $\alpha$ 1 $\beta$  não afetou as variações de cálcio induzidas por agonistas seletivos de TRPV1 (capsaicina) ou TRPV4 (GSK 1016790A), em diversos tipos celulares (Tonello *et al.*, 2017).

O nosso grupo de pesquisa demonstrou que o bloqueio do CCVD do subtipo N, através da toxina nativa Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , preveniu a nocicepção, a inflamação e as alterações funcionais vesicais associadas ao modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, em camundongos (Silva *et al.*, 2015). Outros dois trabalhos do grupo destacaram a relevância terapêutica do peptídeo Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , para controlar o prurido refratário (Maciel *et al.*, 2014), assim como, na atenuação de parâmetros histopatológicos e inflamatórios associados ao modelo de glioblastoma multiforme em camundongos (Nicoletti *et al.*, 2017).

O cálcio tem sido implicado como um importante mensageiro em doenças inflamatórias autoimunes do SNC, através da ativação de diversos tipos celulares, como células T, que necessitam da sinalização de cálcio para sua ativação (Quintana *et al.*, 2011; Stokes *et al.*, 2016). Nas células da glia, níveis elevados de cálcio intracelular podem induzir excitotoxicidade e aumento da liberação de quimiocinas. O mesmo pode ser observado para oligodendrócitos, que em condições autoimunes podem mediar a desmielinização (Smith *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2014). Igualmente, um número crescente de trabalhos tem estudado a atividade do cálcio a nível de SNC, devido a sua importância na regulação da neuroplasticidade e da apoptose (Balog *et al.*, 2016). Modelos animais de EM têm demonstrado fortes evidências acerca do papel que os canais de cálcio desempenham na neurodegeneração, principalmente, devido ao aumento da sinalização do cálcio nos neurônios e a participação fundamental na ativação de proteases, como

a calpaína, bem como, na disfunção da membrana mitocondrial (**Figura 9**) (Fairless *et al.*, 2014).



**Figura 9. Representação das vias de entrada do cálcio em condições fisiológicas e inflamatórias.** O aumento intracelular de cálcio em condições inflamatórias, no corpo do neurônio (b) e no axônio (d), conduzem à morte neuronal (e). NMDA-R, receptor N-metil-D-aspartato; Kainate-R, receptor cainato; AMPA, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico; ASIC, canal iônico sensível a ácido; NCX, trocador sódio-cálcio; Nav1.6, canais de sódio do subtipo 1.6; N-type VDCC, canais de cálcio voltagem-dependentes do subtipo N; PMCA, ATPase de membrana plasmática. Extraído de: *Dysfunction of neuronal calcium signalling in neuroinflammation and neurodegeneration* (número de licença para uso da imagem: 4185950054305; Copyright Clearance Center) (Fairless *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a investigação dos mecanismos anti-inflamatórios e antinociceptivos desempenhados pelo peptídeo CTK 01512-2 na EM, se torna bastante interessante, principalmente por suas habilidades em afetar os sistemas fisiológicos, em particular, aqueles relacionados à modulação de cálcio, com consequente desfecho na inflamação.

## 2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados para identificar peptídeos ativos naturais de venenos de diferentes espécies que podem ser usados em uma variedade de aplicações médicas, em especial, nas doenças neurodegenerativas, bem como, em doenças relacionadas à dor e à inflamação. Essa busca deve-se à seletividade desses peptídeos por vários subtipos de canais iônicos. Além de possíveis alvos terapêuticos, os peptídeos podem ser empregados como ferramentas farmacológicas sendo usados para modular ou autorregular canais iônicos e receptores acoplados à proteína G, permitindo avaliar a sua relevância na patofisiologia de diferentes doenças (Zamponi, 2016; Prashanth *et al.*, 2017).

O interesse na caracterização bioquímica e farmacológica de toxinas como, por exemplo, da aranha *P. nigriventer*, tem aumentado nas últimas décadas. A relevância desses peptídeos está relacionado à sua capacidade de bloquear os canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD), bem como os receptores de potencial transitório anquirina 1 (Gomez *et al.*, 2002; Palhares *et al.*, 2017; Tonello *et al.*, 2017). O cálcio tem sido implicado em doenças inflamatórias do sistema nervoso central, através da ativação de diversos tipos celulares como, por exemplo, os linfócitos T e conseqüentemente modulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Hendy *et al.*, 2016; Phan *et al.*, 2017). Sendo esses canais a principal via de entrada do cálcio para os neurônios, tem-se investigado os peptídeos derivados da *P. nigriventer*, por sua habilidade em afetar um grande número de sistemas fisiológicos, em particular, aqueles relacionados aos processos dolorosos e inflamatórios (Silva *et al.*, 2015).

Como demonstrado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, o peptídeo Ph $\alpha$ 1 $\beta$  apresenta atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias em diferentes paradigmas experimentais em roedores. Considerando que esses sinais e sintomas são componentes que contribuem para a gravidade dos quadros de EM, assim como, o número limitado de adjuvantes terapêuticos para forma progressiva da doença, torna-se de grande relevância a realização de estudos para identificar os possíveis efeitos farmacológicos desempenhados pelo peptídeo da aranha *P. nigriventer* na sua versão recombinante, CTK 01512-2, na EM.

Desta forma, os resultados do presente estudo podem ser fundamentais para identificar novas alternativas e adjuvantes para o tratamento da EM, bem como, para determinar a relevância do CCVD para esta doença, contribuindo para o avanço científico nas áreas de Neurofarmacologia e Toxinologia.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de CTK 01512-2, uma versão recombinante do peptídeo Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , obtido do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em parâmetros comportamentais, bioquímicos, histológicos, imunológicos e imaginológicos, no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos, comparando as ações deste peptídeo às aquelas produzidas pelo fármaco derivado do caramujo *Conus magus*, a ziconotida ou, pelo medicamento utilizado no tratamento da esclerose múltipla, fingolimode, neste modelo animal.

#### 3.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar os efeitos da administração intratecal de CTK 01512-2 ou da ziconotida, assim como, da administração sistêmica do fármaco fingolimode, sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica, no modelo de EAE induzido pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub> em camundongos;
- ii. Verificar os efeitos da administração epidural do peptídeo recombinante, CTK 01512-2, ou da ziconotida, bem como do medicamento fingolimode, por via oral, sobre a incapacidade e coordenação motora, no modelo animal de esclerose múltipla induzido por MOG<sub>35-55</sub>;
- iii. Analisar os efeitos da administração intratecal de CTK 01512-2 ou da ziconotida, assim como do fármaco fingolimode, por via oral, sobre o déficit cognitivo, 7 ou 11 dias após a indução de EAE em camundongos;
- iv. Avaliar os efeitos da administração epidural do peptídeo recombinante CTK 01512-2 ou da ziconotida, bem como, do medicamento de uso oral, o fingolimode, sobre o escore clínico e a severidade neurológica, no modelo de EAE evocado por MOG<sub>35-55</sub> em camundongos;
- v. Avaliar os efeitos da administração intratecal de CTK 01512-2 ou da ziconotida, assim como do fingolimode, por via oral, sobre a produção de citocinas (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-23, IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL3 e leptina) na medula espinhal, no encéfalo, no baço e/ou no soro, 25 dias após a indução de EAE em camundongos;
- vi. Analisar os efeitos da aplicação intratecal de CTK 01512-2, da ziconotida ou do fingolimode, por via oral, sobre o infiltrado inflamatório leucocitário (HE) e no dano axonal (luxol), na medula espinhal e encéfalo, 25 dias após a aplicação de MOG<sub>35-55</sub> em camundongos.

- vii. Verificar os efeitos da injeção intratecal de CTK 01512-2, da ziconotida ou do fingolimode por via oral, sobre a ativação astrócitos (GFAP) e microglia (Iba-1), na medula espinhal e encéfalo, 25 dias após a indução do modelo animal de esclerose múltipla (EM).
- viii. Avaliar os efeitos do peptídeo recombinante CTK 01512-2, da ziconotida ou do fingolimode, sobre a atividade cerebral através da técnica de microPET nos dias 7, 14 e 23, após a indução de EAE pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub> em camundongos.
- ix. Analisar os efeitos da administração sistêmica de CTK 01512-2 ou da ziconotida, assim como do fingolimode, sobre os parâmetros comportamentais de nocicepção, memória, atividade locomotora, coordenação motora, escore clínico, peso corporal e do baço, no modelo animal de EM induzido pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub>.

## CAPÍTULO II

### **MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL**

Os resultados do presente estudo foram submetidos à revista *Molecular Neurobiology*, fator de impacto 6.190 (JCR: 2017). Revista indexada-Qualis A1 (ISSN: 0893-7648).

## **Beneficial effects of the calcium channel blocker CTK 01512-2 in a mouse model of multiple sclerosis**

Rodrigo B. M. Silva<sup>1,5</sup>, Samuel Greggio<sup>2,3</sup>, Gianina T. Venturin<sup>2</sup>, Jaderson C. da Costa<sup>2</sup>, Marcus V. Gomez<sup>4</sup> and Maria M. Campos<sup>1,5,6,7\*</sup>

<sup>1</sup>Escola de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa Pré-Clínica, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul – Brain Institute (BraIns), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 90610-000, Brazil.

<sup>3</sup>Escola de Ciências da Saúde, Curso de Graduação em Biomedicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

<sup>4</sup>Núcleo de Pós-Graduação, Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 30150-240, Brazil.

<sup>5</sup>Escola de Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa de Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

<sup>6</sup>Escola de Ciências da Saúde, Curso de Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

<sup>7</sup>Escola de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

### ORCID ID

Rodrigo B. M. Silva: 0000-0001-6284-7387

Samuel Greggio: 0000-0002-5187-0335

Gianina T. Venturin: 0000-0001-7696-8219

Jaderson C. da Costa: 0000-0001-6776-1515

Marcus V. Gomez: 0000-0002-6082-930X

Maria M. Campos: 0000-0002-1153-3633

\*Corresponding author: Maria Martha Campos, Centro de Pesquisa de Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone number: +55 51 3320 3562. E-mail address: [camposmmartha@yahoo.com](mailto:camposmmartha@yahoo.com); [maria.campos@pucrs.br](mailto:maria.campos@pucrs.br)

**Acknowledgments**

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)-AUX-PE Toxinologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), in addition to a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) research grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) # 01.11.0014-00, Brazil. Rodrigo B. M. Silva is a pharmacology PhD student receiving grants from CAPES. Maria M. Campos is a researcher career awardee of CNPq (303842-2014-8). We would like to thank Janaína Pasetti Nunes for her valuable technical assistance in histological processing.

## Introduction

Calcium is a potent endogenous regulator of cell signalling, and its role in neurological and psychiatric diseases has been extensively reviewed [1-3]. Voltage-gated calcium channels (VGCCs) are key players of calcium entry into neurons, and they are classified as high voltage-activated (N-, L-, P-, Q- and R-types) or low voltage-activated (T-type) channels [4,5]. Nine of ten VGCCs isoforms are expressed in the nervous system, in cell bodies of neurons, dendritic and axon regions, pre-synaptic nerve terminals, and primary afferent nerves in the spinal dorsal horn. Dysfunctional calcium channels have been implicated in several diseases, such as ataxia, migraine, pain, Parkinson's disease and epilepsy [3,6,7]. In addition, many groups have reported that VGCCs might play a critical role in chronic neuroinflammation [8-10].

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating and autoimmune disease that affects the central nervous system (brain and spinal cord) [11]. According to the Multiple Sclerosis International Federation, approximately 2.5-million people are affected by MS, and there is currently no cure for this disease [12]. Classically, MS has been regarded as the result of peripheral immune system activation (lymphocytes, macrophages, antigen-presenting cells) with consequent destruction of protective myelin sheaths that surround nerve fibres, due to oligodendrocyte loss, cytokine release, microglia activation and chronic oxidative injury [13,14]. The most common clinical symptoms are fatigue, vision impairment, motor incoordination, sensory disturbances, pain, cognitive deficits, as well as urinary frequency [12,15]. In the progressive form, MS has a substantial economic impact, mainly by compromising young adults, with neurological disability associated with incapacity to work and early retirement [16,17]. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a classical model to study MS in rodents [18]. EAE model has been translated successfully into effective treatments for MS patients, such as fingolimod, interferon- $\beta$ , as well as some monoclonal antibodies [19]. Of note, Tokuhara and colleagues showed that EAE induction in mice lacking the  $\alpha 1\beta$  subunit of N-type VGCC resulted in a mild form of the disease [20]. Furthermore, it has recently been shown that nimodipine, a selective L-type VGCC blocker, induced microglial apoptosis by decreasing the levels of nitric oxide (NO), inducible NO synthase (iNOS) and reactive oxygen species (ROS) in a mouse EAE model, besides displaying apoptotic effects in cultured microglial cell lineages [21].

Peptide toxins isolated from animal venoms either inhibit or activate a large number of targets such as acetylcholine receptors, coagulant/anticoagulant besides voltage-gated sodium and calcium channels [22,23]. CTK 01512-2 is a recombinant version of the peptide Ph $\alpha 1\beta$ , derived from the Brazilian armed spider *Phoneutria nigriventer* [24,25]. Several studies

reported that Ph $\alpha$ 1 $\beta$  toxin exhibits marked antinociceptive effects in pre-clinical pain models, through the inhibition of N-type VGCCs [26-28]. In addition, our group demonstrated that spinal blockage of N-type VGCC by Ph $\alpha$ 1 $\beta$  attenuated nociceptive and inflammatory events associated with haemorrhagic cystitis, including bladder oxidative stress, neutrophil migration and cytokine production [29]. Recently, Tonello and colleagues reported that CTK 01512-2 inhibited the calcium influx induced by allyl isothiocyanate, a TRP ankyrin 1 (TRPA1) agonist, as assessed in hTRPA1-HEK293 cells, IMR90 fibroblasts or dorsal root ganglion neurons [24]. CTK 01512-2 also caused a significant reduction of tumor development in an orthotopic mouse glioblastoma model [30]. The N-type VGCC blocker ziconotide, obtained from the cone snail *Conus magus* and commercially known as Prialt<sup>®</sup>, was approved by the FDA in 2004 and it is used for the management of chronic intractable pain [31]. This reinforces the notion that VGCC inhibitors might be clinically useful, with a satisfactory safety profile.

Considering the limited number of therapeutic options to control signs, symptoms, and progression of MS and the potential relevance of calcium channels for neuroinflammation, the present study sought to characterize the effects of CTK 01512-2 on behavioural, biochemical, histological, immunological and imaging parameters in the mouse model of EAE. Actions of CTK 01512-2 were compared to those produced by ziconotide or, by the drug used in clinics for MS, fingolimod, in this animal model. Herein, we provide novel evidence, indicating that CTK 01512-2, possibly by blocking calcium influx, displays beneficial effects in the mouse model of EAE.

## Materials and methods

### Experimental animals and ethical statement

All animal experimental procedures complied with the National Institutes of Health Animal Care Guidelines (NIH publications n° 80-23), and were approved by the Animal Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS, Porto Alegre, Brazil) (protocol number 14/00424). Female C57BL/6 mice (18-22 g, 6-8 weeks old, total number: 197 animals) were obtained from the Center of Experimental Biological Models (CeMBE/PUCRS). The animals were housed in a room with controlled temperature ( $22 \pm 1$  °C) and humidity (50-70%) under a 12:12 h light-dark cycle (lights on 07:00 AM). Food and water were provided *ad libitum*. The animals were randomly distributed among the experimental groups, and all the behavioural assessments were conducted without knowledge of the treatments to reduce the experimental bias. The number of animals and the intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects. The description of the data for this study is in agreement with the “Checklist for reporting and reviewing studies of experimental animal models of multiple sclerosis and related disorders” [32].

### Study design - EAE induction, clinical scoring and animal care

EAE was induced on day 0 by a subcutaneous immunization into the flanks with 200 µg of myelin oligodendrocytes glycoprotein (MOG<sub>35-55</sub>) peptide, dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA) supplemented with 500 µg of *Mycobacterium tuberculosis* extract H37Ra (total volume: 200 µL per animal). This procedure was repeated after 7 days to increase the incidence of EAE, as previously described [33]. Additionally, the animals were also injected intraperitoneally (i.p.) on days 0 and 2 post-immunization with 300 ng of *Pertussis* toxin to increase the permeability of the blood-brain barrier. Non-immunized (naïve) and EAE animals were used as negative and positive control groups, respectively. Mice were monitored daily and were weighted every 5 days (as parameters of health), for up to 25 days. To assess the neurological impairment, a clinical EAE scoring system was used according to the following scale: score 0, no disease; score 1, loss of tail tone; score 2, hindlimb paresis; score 3, hindlimb paralysis; score 4, tetraplegia; and score 5, moribund and or death [34]. Clinical signs were measured 7 days post-immunization, every 2 days, over a total period of 25 days. The mice that did not develop the disease were excluded from the study. A humane end-point was adopted when: (i) weight loss exceeded 20% of the mouse initial weight; (ii) if a mouse reached a clinical score of 5; (iii) if a



mouse was unable to right itself, or (iv) if the animal exhibited a total loss of ability to access food and water for 24 h.

### **Pharmacological treatment protocols**

The animals were treated intrathecally (i.t.) according to the technique described by Hylden and Wilcox [35], with minor modifications. The animals were slightly anesthetized with sevoflurane, and a needle connected to a 10- $\mu$ L microsyringe was introduced through the skin. Subsequently, 5  $\mu$ L of PBS containing the recombinant peptide CTK 01512-2 (25, 50 or 100 pmoles/site) or ziconotide (25, 50 or 100 pmoles/site) were injected between the L5 and L6 vertebral spaces. Fingolimod, which is a sphingosine-1-phosphate receptor modulator, was administered by the oral route (p.o.), once a day, for 19 days (days 7-25), beginning to count at the time of the first MOG<sub>35-55</sub> injection (day 0). CTK 01512-2 and ziconotide were administered on the 4<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> days after EAE induction by MOG<sub>35-55</sub>. The control animals received the same volume of PBS i.t. or p.o. For the systemic treatment, mice were also slightly anesthetized with sevoflurane, and CTK 01512-2 (0.2 mg/kg) or ziconotide (0.2 mg/kg) were injected by retro-orbital route, every three days, after 7 days of the first MOG<sub>35-55</sub> application (7<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 19<sup>th</sup>, 22<sup>nd</sup> and 25<sup>nd</sup> days). The protocols of treatment for all the tested drugs (doses, route of administration and time of injection) were chosen in accordance with previous publications [36,29,37,38].

### **Mechanical hypersensitivity**

To assess the mechanical hypernociceptive response, mice were placed individually in clear Plexiglas boxes (9 x 7 x 11 cm) on elevated wire-mesh platforms to allow access to the ventral surface of the right hind paw [33]. The animals were acclimatized for 1 h before behavioural testing, and mechanical hypersensitivity was evaluated at several time-points (2<sup>nd</sup>-14<sup>th</sup> day). The withdrawal response frequency (in percentage) was measured following 10 applications (with a duration of 3 s each, and interval of 15 s among each) of von Frey hairs (VFHs, North Coast, Gilroy, USA). Stimuli were delivered from below to the plantar surface of the right hind paw. The 0.4 g VFH produces a mean withdrawal frequency of about 15%, which is considered an adequate value for the measurement of mechanical hyperalgesia [39]. In order to determine the basal mechanical thresholds, all the groups were evaluated before disease induction. The incidence of mechanical hyperalgesia was ~75% in the positive control group (vehicle).

### **Thermal nociception**

The hot-plate test was used to measure the thermal response latencies according to the method described by Tsagareli [40], with some modifications. In these experiments, the hot-plate apparatus (Ugo Basile, Verese, Italy) was maintained at  $50 \pm 1$  °C. The animals were placed into a glass cylinder 20-cm in diameter on the heated surface, and the time between placement and jumping or licking the paws was recorded as the index of response latency. A 30-s cut-off was adopted as the maximal time of reaction to avoid tissue damage. All the animals were evaluated before disease induction to determine the basal thermal threshold. Thermal nociception was assessed at several time points until day 15, since after this day the clinical signs of EAE, such as motor incoordination, were visible. Thermal hypersensitivity evoked by EAE model was reproducible throughout the different experimental sets, with the latency ranging between 10 and 15 seconds for the positive control group (vehicle).

### **Spatial memory test**

The spatial memory was evaluated at day seven or day eleven (acute phase) after the first MOG<sub>35-55</sub> administration, using the object location test. The apparatus used in the study was an acrylic open-field arena (46 x 46 x 36 cm), placed in a sound-isolated room, under a weak red light ( $8 \pm 2$  lux). On day 7 or day 11, the mice were individually placed in the center of the arena for 5 min, where they were allowed to explore two identical copies of plastic rectangles (4 x 2 x 2 cm; named training phase). Both types of objects could be either white or black, and they were placed 7 cm away from the walls of the apparatus. The arena was cleaned with 30% alcohol after each animal was tested. Ninety minutes after the training phase, mice were returned to the arena for the testing phase, when they were allowed to explore one copy of the object at the same location and one copy of the object at a novel location. The time spent by the animals exploring (when mice sniffed, whisked or looked at the objects from no more than 1 cm away) the objects at new (novel) and at old (familiar) locations was recorded over 5 min. All locations of the objects were counterbalanced among the groups. To analyze the cognitive performance, a location index was calculated as previously described by Dutra et al., 2013 [41]:  $(T_{\text{novel}} \times 100) / (T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})$ , where  $T_{\text{novel}}$  is the time spent exploring the displaced object and  $T_{\text{familiar}}$  is the time spent exploring the non-displaced object. The test is based on the spontaneous preference of mice, previously exposed to two identical objects, for the novel location, and has been used for the assessment of hippocampal-dependent memories [41,42].

### **Rotarod activity**

The ability of mice to maintain balance and motor coordination was evaluated through the rotarod apparatus (Insight, Ribeirão Preto, Brazil). The apparatus consists of a rod (3-cm in diameter) with 5 flanges at intervals, allowing for up to 4 mice to be tested simultaneously. Mice were placed in the rotarod at a constant speed of 16 rpm until 60 s. The latency to fall was automatically recorded in seconds. All the animals were given a habituation training session on the apparatus (inter-trial interval of 3 min to minimize the effect of fatigue), prior to EAE induction, and consisted of three consecutive trials, in which the animals became familiar with the task. After disease induction, the mice were tested every two days, until 25 post-immunization.

### **Activity monitor - open field**

To evaluate the spontaneous locomotor activity, an automatic open field system consisting of an acrylic box (46 x 46 x 36 cm) with infrared sensors (Activity monitor, Insight, Ribeirão Preto, Brazil) was used. Mice were habituated in the behavioural testing room for at least 30 min. During the tests, the animals were placed in the automatic open field apparatus for 6 min, with 1 min for habituation and exploration of the arena, and 5 min of locomotor evaluation. The apparatus was cleaned at each behavioural test performed with alcohol 30°, as recommended by the manufacturers. The activities detected were ambulatory movement, distance travelled (mm) and speed (mm/s). The movements are monitored on the x, y and z-axes, which represent height, width and depth, respectively.

### **Neurological state**

An eight-point neurological severity score (NSS) was used to measure the general neurological state of mice, according to the scale described by Dutra et al. [41], with minor modifications. This score mimics the Expanded Disability Status Scale (EDSS) that is used in MS patients. Each animal was evaluated for the following parameters: presence of paresis; inability to walk straight; impairment of seeking behaviour; absence of a perceptible startle reflex; inability to exit from a 30-cm-diameter circle; and inability to walk on 3-, 2-, and 1-cm-wide beams. If the mouse demonstrated incapacity in one of these parameters quoted above, a value of one was inferred for each trait. The total sum of the values was used as an indicative of neurological impairment. NSS was analysed 23 days after the first MOG<sub>35-55</sub> administration.

### **Analysis of cytokines production and splenomegaly**

Levels of TNF, IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-23, IL-10, IFN- $\gamma$ , CCL3 and leptin were evaluated in serum, spleen, spinal cord and brain, except leptin that was evaluated only in serum. After 25 or 15 (leptin) days of disease induction, the mice were euthanized and the structures were collected and frozen (-80 °C) for further analysis. Posteriorly, the tissues were homogenized according to the methodology described previously by Fernandes et al. [43]. Cytokine levels were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using dual-set ELISA kits, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems; Minneapolis, USA). The results were expressed in picograms per hundred milligrams of tissue or per hundred millilitres of serum. As an additional index of the inflammatory process, the wet weight of each spleen (splenomegaly) was registered and expressed as grams per twenty-five grams of animal body weight.

### **Histological analysis**

After the euthanasia (25 days post-EAE induction), the brains and the lumbar spinal cords (L1-L6) were fixed in 10% buffered formalin solution for 24 h. After this period, the samples were embedded in paraffin after dehydration. The histological analysis of inflammation and demyelination was performed using haematoxylin-eosin (HE) and luxol fast blue (LFB) staining, respectively. Procedures were performed in 4- $\mu$ m brain and spinal cord slices. Each HE-stained section was scored for inflammation from 0 to 4: 0, indicated normal; 1, indicated cells infiltrating the meninges; 2, indicated one to four small focal perivascular infiltrates; 3, indicated five or more small infiltrates and/or one or more large infiltrates invading the parenchyma, and 4, indicated extensive cell infiltration involving  $\geq$  20% of the white matter. [44]. Demyelination of the brain and spinal cord was scored as described by Rynda et al., (2010) with 0 indicating normal, 1 indicating one small focal area of demyelination, 2 indicating two or three areas, 3 indicating one to two large areas of demyelination, and 4 indicating extensive demyelination involving  $\geq$  20% of the white matter. [45].

### **Immunohistochemistry assay**

The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), which are biochemical markers of astrocyte and microglia activation, respectively, was measured by immunohistochemistry. The brain and the lumbar spinal cord

(L1-L6) were rapidly excised (at day 25 post-immunization), and immediately fixed in 10% formalin solution for 24 h. The immunopositivity for GFAP or Iba1 was assessed on paraffin tissue sections (4  $\mu$ m) by using the monoclonal rabbit anti-GFAP (1:250; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and monoclonal mouse anti-Iba1/AIF1 (1:300; Cayman Chemicals, Michigan, USA), according to the method previously described [46]. High-temperature antigen retrieval was performed by immersing the slides in water bath at 98 to 100 °C in Tris/EDTA buffer, pH 9.0 (anti-GFAP) and 10 mM trisodium citrate buffer, pH 6.0 (anti-Iba1), for 40 min. The peroxidase was blocked by incubating the sections with 5% perhidrol for 30 min. The nonspecific protein binding was blocked with 5% milk serum solution for 30 min. After overnight incubation at 4 °C with primary antibodies, the slides were washed with PBS and incubated with the secondary antibody HRP conjugate (Invitrogen, Carlsbad, USA), ready to use, for 20 min at room temperature. The immune complexes were visualized with 0.5% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) plus 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. The reaction was stopped by thorough washing with water, and the slides were counterstained with haematoxylin. Images to assess glial activation were examined with a Zeiss AxioImager M2 light microscope (Carl Zeiss, Gottingen, Germany). For each section, 2 to 5 images were taken, in order to include most areas of the brain and lumbar spinal cord. The images were captured in 100 or  $\times$ 200 magnification. The number of GFAP-positive astrocytes and Iba1-positive microglia cells/region was quantified in the following anatomical areas of the lumbar spinal cord: right dorsal horn, left dorsal horn, right ventral horn, left ventral horn and central canal. The analyzed brain areas were: cerebral cortex, cerebral nuclei, brain stem (midbrain, hindbrain) thalamus, hypothalamus and cerebellum.

### **MicroPET imaging**

In order to assess neuroinflammation in the mouse EAE model, the technique of [<sup>18</sup>F]-FDG microPET imaging was used, as referenced by Radu et al., 2007 [47]. The animals were randomly divided into five experimental groups: PBS, EAE + vehicle, EAE + CTK 01512-2 (50 pmoles/site, i.t.), EAE + ziconotide (50 pmoles/site, i.t.) and EAE + fingolimod (0.3 mg/kg, p.o.). Initially, the animals were individually anesthetized using a mixture of isoflurane and medical oxygen (3–4% induction and 2–3% maintenance dose) and [<sup>18</sup>F]-FDG was injected (250  $\mu$ Ci) through the tail vein. After recovery from anesthesia, the mice remained isolated and conscious for 40 min. Mice were placed in a headfirst prone position, and scanned with the Triumph<sup>TM</sup> microPET (LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA), under isoflurane inhalation. Throughout these procedures, the animals were kept on a pad heated at 36 °C. For

30 min, each animal was scanned with the brain region positioned in the center of the microPET field-of-view (FOV). At the end of the acquisition, mice were returned to their cages until complete recovery, and kept under heating to prevent hypothermia. The animals were scanned on days 7, 14 and 23 after the first MOG<sub>35-55</sub> application, totalizing 180 microPET scans. All data were reconstructed using the maximum likelihood estimation method (MLEM-3D) algorithm with 20 iterations. Each reconstructed microPET image was spatially normalized into a [<sup>18</sup>F]-FDG template using brain normalization in PMOD (version 3.5) and the Fusion Toolbox (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). A MRI mouse brain template was used to overlay the normalized images, previously registered to the microPET image database. The glucose metabolism was expressed as standardized uptake values (SUVs) for several brain regions [48].

### Data analysis

Results are presented as the mean  $\pm$  standard error mean of 6 to 21 animals per group, depending on the experimental protocol, as specified in each figure. The percentages of inhibition were calculated for every experiment, and in some cases, the area under curve (AUC) was used for this purpose. Statistical comparisons of the data were performed by using one- or two-way analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental protocol, followed by Newman-Keuls or Bonferroni's post-test. *P*-values  $< 0.05$  were considered significant. All tests and the construction of graphs were performed using the GraphPad Prism<sup>®</sup> software version 5.01 (San Diego, USA).

### Materials

The following drugs and reagents were used: MOG<sub>35-55</sub> peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) was purchased from EZBiolab (Carmel, USA). *Mycobacterium tuberculosis* extract H37RA was obtained from Difco Laboratories (Detroit, USA). Complete Freund's adjuvant oil and *Pertussis* toxin were purchased from Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, USA). Giotto Biotech S.r.l. (Sesto Fiorentino, Italy) synthesized the recombinant peptide CTK 01512-2. Ziconotide was purchased from Latoxan (Valence, France). CTK 01512-2 and ziconotide were diluted in PBS and fingolimod was solubilized in distilled water. [<sup>18</sup>F]-FDG was produced by an on-site cyclotron (PET Trace 16 MeV; GE Medical System) and automated synthesis system (Fastlab GE).

## Results

### Mechanical and thermal hyperalgesia are attenuated by CTK 01512-2 and ziconotide in the mouse model of EAE

As it can be seen in Figure 1A and 1B, during the EAE induction phase (days 0-7), there was a significant and long-lasting increase in the response frequency after von Frey filaments application (0.4 g; which represents an innocuous stimulus), in the right hind paw of the mice, indicating the occurrence of mechanical hypersensitivity. This process started on day 2, and remained elevated for up to 14 days after the first MOG<sub>35-55</sub> administration (Figure 1A). The treatment with CTK 01512-2 or ziconotide (25, 50 and 100 pmoles/site), by i.t. route, significantly reduced the mechanical hypersensitivity in animals with EAE, until the 14<sup>th</sup> day, with inhibitions of:  $24 \pm 3\%$ ,  $47 \pm 11\%$  and  $56 \pm 5\%$ ; and  $20 \pm 3\%$ ,  $46 \pm 4\%$  and  $25 \pm 6\%$ , respectively, according to the calculated AUC (Figure 1B). Of note, CTK 01512-2 produced a characteristic dose-response effect. Conversely, ziconotide showed a U-shaped curve profile. In addition, it was possible to observe that the antinociceptive effect of the recombinant peptide CTK 01512-2 was maintained until the 8<sup>th</sup> day, even with the treatment onset 4 days before. In contrast, the analgesic effect of ziconotide was diminished (Figure 1A). To assess the effect of fingolimod (the drug used in clinics for MS) in mechanical hypernociceptive response, mice were treated from day 7 to day 25, once a day, p.o. Fingolimod (0.3 mg/kg) treatment showed similar results to that obtained with the dose of 25 pmoles of both peptides ( $19 \pm 6\%$  of inhibition) (Figure 1B).

A separate group of mice was intrathecally treated with CTK 01512-2 or ziconotide to assess the effects on EAE-related thermal hyperalgesia. A reduction in the paw withdrawal latency to heat stimulus was observed at 3 days after MOG<sub>35-55</sub> immunization, as an indicative of thermal hypersensitivity. This effect remained stable until day 15 (Figure 1C). When the animals received CTK 01512-2 (50 and 100 pmoles/site, i.t.) or ziconotide (50 pmoles/site, i.t.,  $p = 0.0927$ ; 100 pmoles/site, i.t.,  $p < 0.05$ ), the thermal hyperalgesia was reduced in comparison to the positive control group (vehicle). The percentages of inhibition were  $37 \pm 6\%$ ,  $66 \pm 3\%$  and  $35 \pm 10\%$ , respectively (Figure 1D). A comparison of CTK 01512-2 and ziconotide (100 pmoles/site, i.t.) effects revealed that CTK 01512-2 showed a superior antinociceptive activity ( $66 \pm 3\%$  versus  $34 \pm 10\%$ ). The treatment with fingolimod showed a tendency to reduce the thermal nociception ( $p = 0.0845$ ; Figure 1D).

### **Intrathecal administration of CTK 01512-2 improves the cognitive deficits related to EAE**

Cognitive impairment can affect up to three-quarters of patients with secondary progressive MS [49]. Therefore, we investigated whether CTK 01512-2 might improve learning and memory impairment during the EAE. Firstly, the short-term spatial memory of mice was evaluated through the object location test. Seven days after EAE induction, the performance in the object location test was significantly impaired, with no difference in the time spent exploring displaced and non-displaced objects (Figure 2B). However, mice treated with CTK 01512-2 (50 and 100 pmoles/site, i.t., day 4) explored the object replaced in a novel location for a longer time, in relation to the non-displaced object, indicating an increase in the location index when compared to the EAE non-treated control group (vehicle) (Figure 2B). The results were similar to the negative control group (naive). The percentages of increase of the location index, in comparison to vehicle group were  $84 \pm 18\%$  and  $60 \pm 8\%$ , respectively. The i.t. application of ziconotide (at all the tested doses) failed to alter the cognitive deficits associated to EAE, as it was also observed for fingolimod. As expected, the results depicted in Figure 2A did not show any difference in the time of exploration of the objects (training phase).

### **The recombinant toxin CTK 015012-2 promotes an improvement of motor coordination from 14 days after MOG<sub>35-55</sub>-induced EAE**

Herein, mice treated with CTK 01512-2 (50 pmoles/site, i.t., days 4, 10, 15, 20 and 24) or fingolimod (0.3 mg/kg, once daily from day 7) demonstrated a longer permanence time in the rotarod apparatus, when compared to the EAE control group (vehicle). The percentages of increase were  $20 \pm 4\%$  and  $15 \pm 3\%$ , respectively (Figure 2D). It is worth mentioning that CTK 01512-2 was able to retard the progression of motor alterations in the EAE model, until the 20<sup>th</sup> day, a sign of great importance in MS. The results observed for CTK 01512-2 were similar to those obtained with the drug used in humans, fingolimod. Alternatively, the N-type VGCC blocker ziconotide failed to improve the locomotor activity of the animals in the three tested doses, when administered on days 4, 10, 15, 20 and 24 after first MOG<sub>35-55</sub> injection. Additionally, our results suggest that animals develop persistent mechanical and thermal hyperalgesia before motor neurological dysfunctions, corroborating previous data by Fairless et al., (2014) and Dutra et al., (2013) [8,33].



### **CTK 01512-2 modulates the progression of disease, clinical symptoms, body weight loss and neurological severity elicited by EAE in mice**

As previously reported by Alberti et al., (2016) [50], mice exhibited the clinical symptoms of EAE from day 13-14 after the beginning of the induction protocol, reaching a maximal clinical score on day 17-18 (Figure 3A, Supplementary videos 1 and 2). In our study, the positive control group (vehicle) did not gain weight during 25 days, with an approximate body weight loss of 1.5 g at day 15 (Supplementary Figure 2A and 2D). In addition, the levels of leptin (an essential hormone that governs satiety/hunger [51], and affects proliferation and cytokine production in naïve and memory T cells [52]) were quantified in serum, 15 days post-EAE induction. MOG<sub>35-55</sub> administration was associated with a marked increase of leptin levels, compared to the negative control group (naïve) (Figure 3D). Of high interest, the treatment with CTK 01512-2 (50 pmoles/site, i.t.), caused a remarkable and significant inhibition of leptin contents ( $38 \pm 15\%$ ; Figure 3D). This effect was not observed in ziconotide and fingolimod groups. In this experimental time-point, there was a significant increase in the severity of disease.

CTK 01512-2 (25-100 pmoles/site) or ziconotide (25-100 pmoles/site) were administered i.t. on days 4, 10, 15, 20 and 24 after the first MOG<sub>35-55</sub> injection to test the therapeutic effect on EAE. Interestingly, the treatment with 50 and 100 pmoles of CTK 01512-2 prevented the occurrence of symptoms implicated in the progression of EAE, when compared to the vehicle group. Both doses delayed the onset of symptoms and reduced the clinical manifestations of EAE, as it can be seen by calculating the AUC, with inhibitions of  $48 \pm 6\%$  and  $37 \pm 5\%$ , respectively (Figure 3B). The same protocol of treatment prevented the body weight loss at the 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> days, when compared to the vehicle group (Supplementary Figure 2A-F). Nevertheless, ziconotide administration (25-100 pmoles/site, i.t.) did not significantly diminish the clinical score or the body weight reduction induced by EAE. The oral daily administration of fingolimod (0.3 mg/kg, from day 7 to day 25) reduced the clinical symptoms associated with the EAE model ( $55 \pm 10\%$ ) and delayed the disease progression (Figure 3A and 3B). The animals treated with fingolimod did not display any body weight loss throughout all the evaluation period (Supplementary Figure 2A-F).

Next, mice were evaluated according to the 8-point scale for neurological severity. As illustrated in the Figure 3C, the administration of MOG<sub>35-55</sub> was associated with an increased neurological severity score, as compared to the negative control group (naïve), and assessed 23 days after EAE induction. Noteworthy, CTK 01512-2 (50 and 100 pmoles/site, i.t., days 4, 10, 15 and 20) prevented EAE-elicited neurological impairment. The inhibition percentages were

33 ± 4% and 31 ± 8%, respectively (Figure 3C). The reference drug fingolimod also reduced the neurological severity score (44 ± 8%). In contrast, ziconotide did not change the neurologic severity score, when administered at the doses of 25, 50 and 100 pmoles/site, by the i.t. route, on days 4, 10, 15 and 20 after the first MOG<sub>35-55</sub> injection.

### **Inhibition of pro-inflammatory cytokines and chemokine production by CTK 01512-2 in the central nervous system, as well as at the systemic level in the animal model of MS**

Based on the obtained results, especially regarding the prevention of neurological deficits and clinical signs, the dose of 50 pmoles/site of CTK 01512-2 was selected for the biochemical, histological, immunohistochemical and imaging experiments, to further characterize its anti-inflammatory and immunomodulatory effects in the EAE model.

The immunization with MOG<sub>35-55</sub> caused a pronounced increment in the levels of the pro-inflammatory cytokines, namely TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-23 in the brain, spinal cord and spleen (except for IL-23), and the chemokine CCL3 in the spinal cord, 25 days after EAE induction (Figure 4 and 5 and Supplementary Figure 3 and 4). Interestingly, the treatment with CTK 01512-2 (50 pmoles/site, i.t., days 4, 10, 15, 20 and 24) significantly reduced the levels of TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-23. The values were close to those observed in the negative control group (naive), according to the evaluation of the spleen, brain and spinal cord, except for IL-1 $\beta$  in the spleen, and IL-23 in brain and spleen. The percentages of inhibition were 83 ± 8%, 60 ± 8% and 84 ± 9% for TNF; 70 ± 4% and 69 ± 8% for IL-1 $\beta$ ; 76 ± 11%, 46 ± 18% and 76 ± 11% for IFN- $\gamma$ ; 74 ± 12%, 76 ± 8% and 75 ± 8% for IL-17; 67 ± 2% for IL-23, respectively. In addition, CTK 01512-2 abolished the elevation of CCL3 levels in the spinal cord (Figure 5F). The animals treated with ziconotide (50 pmoles/site, i.t., on days 4, 10, 15, 20 and 24) had reduced levels of IL-1 $\beta$  and IL-23 in the CNS, as well as IL-17 production in the spleen, 25 days after MOG<sub>35-55</sub>-elicited EAE.

The treatment with fingolimod, at a dose of 0.3 mg/kg, orally, once a day, from day 7 to day 25, reduced the levels of TNF (spleen and spinal cord), IL-1 $\beta$  (spinal cord), IFN- $\gamma$  (spleen and brain), IL-17 (spleen and spinal cord) and CCL3 (spinal cord), in the EAE model. This effect occurred in a significant manner, with inhibition percentages of 85 ± 5% and 35 ± 14% for TNF; 40 ± 21% and 46 ± 4% for IL-1 $\beta$ ; 81 ± 4% and 60 ± 9% for IFN- $\gamma$ ; 60 ± 9% and 60 ± 12% for IL-17; 86 ± 6% for CCL3, respectively (Figure 4 and 5; Supplementary Figure 3 and 4).

As depicted in the Figure 5H, EAE induction caused splenomegaly in the positive control group (vehicle), as well as in the ziconotide group (at dose of 50 pmoles/site), compared

to the naïve group, as assessed by determination of spleen weight, at 25 days post-MOG<sub>35-55</sub> application. The spleen weight was sensitive to fingolimod treatment (0.3 mg/kg), dosed once a day, by oral route, from day 7 to day 25. The recombinant peptide CTK 01512-2 (50 pmoles/site) significantly reduced EAE-elicited splenomegaly, reaching values close to those of the naïve group.

### **Intrathecal administration of CTK 01512-2 increases the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the animal model of EAE**

In the present study, IL-10 levels were analysed in serum, spleen, brain and spinal cord, 25 days post-EAE induction. In the Supplementary Figure 3G and Figure 4G, it is possible to observe that there was a reduction in spleen and brain IL-10 levels, when compared to the negative control group (naïve). The pharmacological treatment with CTK 01512-2 (50 pmoles/site, i.t., on days 4, 10, 15, 20 and 24) increased IL-10 production in the spleen, brain and spinal cord in relation to the negative control group (vehicle) (Supplementary 3G, Figure 4G and 5G, respectively). This effect occurred in a significant manner, with a raise percentage of  $108 \pm 28\%$ , in the spinal cord, when compared to the naïve group (Figure 5G). The same was observed in the spleen and spinal cord after fingolimod injection (0.3 mg/kg, p.o., 1x daily, starting at day 7). In contrast, ziconotide administration, at the same dose as CTK 01512-2, was not able to alter IL-10 levels in the EAE model.

### **CTK 01512-2 diminished inflammatory infiltrate and demyelination in EAE mice**

Inflammatory infiltration and demyelination were evaluated by HE and LFB staining, respectively. Histopathologic evaluation showed that MOG<sub>35-55</sub> induced a marked increase of inflammatory and demyelination scores in the lumbar spinal cord ( $2.0 \pm 0.5$  and  $2.4 \pm 0.4$ ; Figure 6A-B and Figure 7A-B) and brain ( $2.2 \pm 0.5$  and  $2.5 \pm 0.4$ ; Figure Supplementary 5A-B and 7E-F), respectively, in EAE mice. Notably, the inflammatory infiltration and demyelination was diminished by CTK 01512-2 administration, at the dose of 50 pmoles/site ( $0.6 \pm 0.2$ , and  $0.8 \pm 0.3$ ), when compared with the positive control group (vehicle), whereas ziconotide and fingolimod failed to significantly alter this parameter in the lumbar spinal cord tissue. A similar response can be observed for brain tissue (Figure 7E-F), except for fingolimod treatment, which reduced the demyelination score ( $1.0 \pm 0.4$ ; Figure 7F). Together, these data indicate that MOG<sub>35-55</sub>-induced neuroinflammation might be mediated by inflammatory infiltrate and demyelination, which in turn could be partially reduced with CTK 01512-2 treatment.

### **CTK 01512-2 prevents glial activation triggered by MOG<sub>35-55</sub>**

It has been demonstrated that MS and EAE model triggers glial activation (microglia, astrocyte) in the central nervous system, an effect that leads to the maintenance of the neuroinflammatory process, and consequently the disease progression [53,54]. Here, we assessed whether these effects could be inhibited by the recombinant peptide CTK 01512-2 and ziconotide (50 pmoles/site, i.t., 4<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> days post-MOG<sub>35-55</sub>). The subcutaneous injection of MOG<sub>35-55</sub> caused a significant increase in the levels of the astrocytic activation marker GFAP, and the microglial marker Iba-1, in the lumbar cord (Figure 6C and 7C) and in brain (Supplementary figure 5C and Figure 7G). CTK 01512-2 significantly prevented the increased activation of glial cells in the mouse lumbar cord (reduction of 65 ± 6% for GFAP, Figure 6C and 7C) and brain (tendency for GFAP,  $p = 0.0938$ , 25 ± 9% for Iba-1; Figure 7G-H and Supplementary 5C-D). The same was observed for ziconotide and fingolimod (0.3 mg/kg, p.o., once a day, starting day 7 post-MOG<sub>35-55</sub>) in the lumbar cord for GFAP (Figure 7C), or in the brain for Iba-1, except for ziconotide (Figure 7H). These results suggest that MOG<sub>35-55</sub>-induced neuroinflammation partly relies on calcium signalling.

### **Effects of CTK 01512-2 on the neuroinflammatory responses induced by MOG<sub>35-55</sub>**

As demonstrated in the Figure 8B-G and Supplementary figure 6, there was no difference in glucose metabolism among the experimental groups, on days 7 and 14 after MOG<sub>35-55</sub> application, in the following brain structures: striatum, cortex, thalamus, amygdala, cerebellum, superior colliculi, inferior colliculi, midbrain, and cingulate cortex. However, on the 23<sup>rd</sup> day, there was a marked increase in the [<sup>18</sup>F]-FDG metabolism in all the analysed structures, suggesting the occurrence of neuroinflammation. For other studied regions, however, increased [<sup>18</sup>F]-FDG uptake was also evident on day 7 (hippocampus; Figure 8E), and on day 14 (hypothalamus and the brain stem; Supplementary figure 6B and Figure 8F). Interestingly, the treatment with CTK 01512-2 (50 pmoles/site, i.t., days 4, 10, 15, and 20) significantly reduced the neuroinflammatory process in all the evaluated brain regions, except for the hippocampus, 23 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection. The same results were observed for the reference drug fingolimod (0.3 mg/kg, p.o., once a day, from day 7), except for the striatum and the cingulate cortex. Ziconotide, at a dose of 50 pmoles/site, was able to attenuate the [<sup>18</sup>F]-FDG uptake in the superior colliculi and the cingulate cortex in the EAE model (Supplementary Figure 6C and 6F). Together, these results suggest that calcium-mediated neuroinflammation contributes to the increased glucose consumption induced by MOG<sub>35-55</sub> in the brain.

**CTK 01512-2 through the systemic administration decreases the symptoms evoked by MOG<sub>35-55</sub> in EAE mice**

Thinking translationally in a potential treatment with greater adherence by MS patients, we decided to administer the peptide CTK 01512-2 through the intravenous route (i.v.) in the EAE-affected mice. As shown in Figure 9 and Supplementary figure 7-8, MOG<sub>35-55</sub> induced a marked increase in mechanical and thermal nociception, clinical score, spleen wet weight, with a reduction of the spatial memory, motor coordination, locomotor activity and body weight in the EAE model. Notably, CTK 01512-2, when applied by the systemic route, at the dose of 0.2 mg/kg, every 3 days, starting on day 7 post-MOG<sub>35-55</sub> injection, reduced all behavioural and non-behavioural parameters mentioned above, showing a similar efficacy when compared to the i.t. application. Interestingly, these effects were not observed in mice treated with ziconotide at the same dose and therapeutic scheme, except for the distance travelled in the open field arena. Fingolimod demonstrated similar results to those presented at the beginning of the study. These results suggest that mice systemically treated with CTK 01512-2 have a significant reduction of the symptoms observed in the animal model of MS. The percentages of inhibition for this experimental set are provided in the Supplementary Table 1.

## Discussion

Several cellular and molecular mechanisms contribute to the neuroinflammatory process in MS. CNS calcium dysregulation has been implicated in reduced neuronal viability, with the activation of glial (especially microglia and astrocytes) and T cells. In turn, massive cytokine production is triggered, and the consequent oligodendrocyte death leads to demyelination and oxidative stress, hence promoting neuroinflammation and neurodegeneration [55,8,56]. In this study, we show for the first time that the recombinant peptide CTK 01512-2 is capable of modulating several of these events. The treatment with CTK 01512-2 attenuated the MS-like clinical symptoms in the mouse model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked EAE, which was mirrored by histopathological, biochemical and neuroimaging evaluation. This study further confirms the relevance of VGCC in MS, pointing out CTK 01512-2 as a potential therapeutic alternative for neuroinflammatory diseases.

Chronic pain affects the majority of MS patients, with a significant interference in the life quality of the affected individuals [12]. It was previously shown that MOG<sub>35-55</sub> injection in mice leads to significant alterations in nociception signalling [57,33]. Notably, we demonstrated that both N-type VGCC blockers, ziconotide and CTK 01512-2, were able to reduce the mechanical and thermal allodynia in the EAE model. Of note, CTK 01512-2 produced a characteristic dose-response effect, displaying a long-lasting action when compared to ziconotide, at the three tested doses. Indeed, a previous study from our group showed that treatment with the native form of CTK 01512-2 (Phα1β) prevented trypsin-induced scratching behaviour for up to 12 h, whereas ziconotide application displayed anti-pruritus effects with a maximal duration of 4 h [37]. Moreover, the analgesic effects of Phα1β or CTK 01512-2 had already been demonstrated in several animal models of pain, including the acute pain induced by capsaicin [58], haemorrhagic cystitis [29], visceral nociception [28], and cancer pain [59]. VGCC play an important role in pain development through the release of excitatory neurotransmitters glutamate, neuropeptides (substance P and calcitonin gene-related peptide), calcium-dependent enzyme activation (mitogen-activated protein kinase) and modulation of nociceptor gene expression [60]. This study provides novel evidence showing the analgesic activity of CTK 01512-2 and ziconotide in the neuroinflammatory-related nociception in the EAE model.

Inflammatory infiltrate and demyelination are common findings in the brain and spinal cord of MS patients, being associated with motor impairment, cognitive deficits and neurological disability [61,62]. In the present study, we demonstrated that EAE-affected mice developed the symptoms mentioned above after MOG<sub>35-55</sub> application, as indicated by the

rotarod test, the spatial memory paradigm, in addition to the clinical and neurological severity scores. Importantly, these parameters were accompanied by an increase in inflammatory infiltrate and axonal damage (demyelination) in the CNS parenchyma. The treatment with CTK 01512-2 prevented neuroinflammation and axonal loss, promoting an improvement of motor coordination, cognition and clinical course of MOG<sub>35-55</sub>-evoked EAE. These results were not observed with ziconotide treatment. Therefore, CTK 01512-2 might have another pharmacological target, in addition to the N-type VGCC. Corroborating with this notion, a recent study conducted by Palhares and colleagues showed that Ph $\alpha$ 1 $\beta$  peptide potentiated in 15-fold the antinociceptive action of the TRP vanilloid 1 blocker SB366791, in a model of acute pain induced by capsaicin [58]. Moreover, Ph $\alpha$ 1 $\beta$  and CTK 01512-2 selectively inhibited calcium responses and currents induced by the TRPA1 agonist, allyl isothiocyanate, in dorsal root ganglion neurons, human fetal lung fibroblasts (IMR90) or HEK293 cells expressing the human TRPA1 [24]. It is tempting to suggest that beneficial effects of CTK 01512-2 in the EAE model are related to the inhibition of calcium influx, likely via N-type VGCC and TRPA1 modulation. Accordingly, Schampel et al. demonstrated that calcium signalling inhibition by nimodipine, a selective L-type VGCC blocker, also promoted favourable effects in a mouse model of MS [21].

It is well recognized that some MS patients might lose weight during disease progression, although the mechanisms underlying this response are not completely understood [63]. Herein, we observed that 15 days after the first MOG<sub>35-55</sub> administration, mice had a significant body weight loss. Thereby, we investigated whether the serum levels of leptin (a mediator of long-term regulation of energy balance that suppresses food intake) were altered. We showed that MOG<sub>35-55</sub> administration significantly increased the production of leptin in serum of vehicle-treated mice. Curiously, the animals treated with CTK 01512-2 had a reduction in leptin levels, and consequently they did not lose weight over the EAE model course. This was not observed in animals treated with ziconotide, or even with the clinically used drug fingolimod. Interestingly, the risk of MS and its severity has been correlated to gene polymorphisms of leptin and leptin receptor, besides altered leptin levels [64]. Added to that, leptin affects *in vitro* proliferation and cytokine production in naïve and memory T cells [65], which might partly explain the onset of the neuroinflammatory process and the motor-related severity in EAE mice, at 14-15 days after MOG<sub>35-55</sub> injection. Nevertheless, this study provides compelling evidence that the recombinant peptide CTK 01512-2 is able to modulate the leptin secretion in the mouse model of MS.

In chronic inflammatory diseases, such as MS, leukocytes that invade the CNS are a major source of inflammatory mediators, including cytokines. EAE is the prototypical animal model for neuroinflammation initiated by tissue-invading leukocytes as seen in MS [66]. Herein, we have documented a significant increase in the levels of several pro-inflammatory cytokines, such as TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-23 and CCL3 in brain and spinal cord of MOG<sub>35-55</sub>-treated mice. In a secondary lymphoid organ as spleen, cytokine production was similar to that observed in the CNS, except for IL-23 and CCL3, suggesting that the inflammatory process at the peripheral level is maintained for up to 25 days after MOG<sub>35-55</sub> injection, what might be an important source of autoreactive T lymphocytes in this model. In contrast, no changes were observed in the serum. Importantly, the treatment with the recombinant peptide CTK 01512-2, given by i.t. route, reduced all the pro-inflammatory cytokines mentioned above in brain and spinal cord after 25 days of EAE induction. Conversely, ziconotide treatment was not effective in reducing the majority of these inflammatory mediators. Fingolimod partially reduced these parameters. In addition to the decrease of pro-inflammatory cytokines in CNS, mice treated with CTK 01512-2 displayed an increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Previously, we have shown that Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , the native form of CTK 01512-2, led to an increase of IL-10 production in the mouse model of haemorrhagic cystitis elicited by cyclophosphamide [29]. Importantly, IL-10 serum levels showed a negative correlation with the EDSS score and IL-10 seems to be effective in mouse models of virus-induced demyelination [67,68].

In MS patients, the destruction of myelin sheath and/or oligodendrocytes in the CNS is associated with microglia activation [69]. Additionally, astrogliosis is one of MS pathological hallmarks [54]. Herein, we showed that treatment of mice with MOG<sub>35-55</sub> led to a significant increase of microglia and astrocyte activation, as indicated by a raise of GFAP and Iba-1 immunoreactivity in the CNS, after 25 days. Moreover, we showed that treatment with either ziconotide or CTK 01512-2 reduced GFAP immunostaining in the spinal cord of MOG<sub>35-55</sub>-treated animals, suggesting that N-type VGCC activates astrocytic cells, thus contributing to the neuroinflammatory process induced by MOG<sub>35-55</sub> in the present experimental paradigm. Regarding the Iba1-positive microglia, this process does not appear to depend exclusively on the N-type VGCC activation, since CTK 01212-5-treated animals showed a marked and significant inhibition of Iba-1 immunopositivity in the brain, while ziconotide treatment failed to alter this parameter. Again, it is tempting to propose the relevance of TRPA1-related calcium influx in the effects of CTK 01512-2 against neuroinflammation. Altogether, the present findings suggest that CTK 01512-2 acts by decreasing the presence of glial cells (astrocytes and



microglia) in the CNS, promoting neuroprotective effects, mainly related to protection towards axonal damage, in EAE-affected mice. Indeed, the L-type VGCC blocker nimodipine was able to induce microglia-specific apoptosis in EAE model evoked by PLP-MBP [21], corroborating our data on the relevance of calcium signalling in experimental MS.

CNS inflammatory lesions in the EAE model might be visualized *in vivo* using [<sup>18</sup>F]-FDG microPET-based imaging, in a non-invasive manner [70]. To further investigate the neuroinflammatory process along the EAE model, we performed a longitudinal evaluation of [<sup>18</sup>F]-FDG brain uptake on days 7, 14 and 23, after the first MOG<sub>35-55</sub> administration. As expected, there was no significant difference in [<sup>18</sup>F]-FDG uptake among the experimental groups at day zero (before EAE induction). Histopathological changes, demyelination, cytokine production and glial activation induced by MOG<sub>35-55</sub> were associated with increased [<sup>18</sup>F]-FDG uptake, as evaluated in twelve brain structures at 23 days, thus supporting the presence of neuroinflammatory lesions in the EAE model used herein. Conversely, on days 7 and 14, no difference was visualized in the analysed brain regions, except for hippocampus, brain stem and hypothalamus. Indeed, comparable results showing EAE-related neuroinflammation, by employing microPET imaging, were observed in the spinal cord of rats and mice [70,47]. In addition, our data showed that treatment with CTK 01512-2 significantly attenuated the glucose hypermetabolism in all brain regions, except for hippocampus, 23 days after MOG<sub>35-55</sub> injection. A similar efficacy was observed for the positive control drug for MS treatment, fingolimod. This study provides compelling evidence indicating the effectiveness of the recombinant peptide CTK 01512-2, given by i.t. route, in the neuroinflammatory processes related to MS.

Next, we examined to what extent CTK 01512-2 might prevent MS-related pathological changes when administered systemically. We showed that i.v. treatment with CTK 01512-2 markedly prevented the parameters of nociception, impaired locomotion and movement, cognition, clinical scores, besides body and spleen weight, in the mouse model of EAE. Conversely, the i.v. administration of ziconotide showed inhibitory effects only on the nociceptive behavior elicited by EAE induction. A recent study conducted by Thell and cols. demonstrated that the nature-derived cyclic peptide kalata B1, when given orally, prevented disease progression in the EAE model. This oral activity was possible due to the presence of cysteine residues in the compound, which in turn confers intrinsic stability to resist to chemical, enzymatic, and thermal degradation [34]. It is important to report that the CTK 01512-2 recombinant peptide has 12 cysteine residues in its structure, in a total of 55 amino acids, which might partially explain the stability and beneficial effects of this compound, when dosed by i.v.

route in the EAE model. Additionally, the i.v. route increases the attractiveness of this molecule as a promising alternative for the treatment of MS.

Altogether, our present results revealed that spinal administration of the calcium channel blocker CTK 01512-2 consistently inhibited the symptoms evoked by MOG<sub>35-55</sub> in mice, probably by reducing the inflammatory infiltrate, demyelination, leptin levels, the production of pro-inflammatory cytokines, astrocytic and microglial activation, brain glucose hypermetabolism, associated with an increase of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 10). These beneficial effects of CTK 01512-2 were superior to the drug used in clinics for MS, fingolimod, in important parameters, such as nociception, spatial memory, IL-10 production, leptin secretion, inflammatory score and spinal cord demyelination. Moreover, splenomegaly and EAE symptoms were attenuated by the systemic administration CTK 01512-2, with a higher efficacy in most evaluated parameters, when compared to fingolimod. Thus, we suggest that in a near future CTK 01512-2 might well be used in combination with current MS therapies, as an innovative strategy for relapsing-remitting and progressive MS form. Finally, these results confirm and extend the idea that calcium influx is an important event in MOG<sub>35-55</sub> induced EAE, and seems to be crucial to neuronal and axonal damage, a remarkable event in MS.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Bergantin LB, Caricati-Neto A (2016) Challenges for the pharmacological treatment of neurological and psychiatric disorders: Implications of the Ca(2+)/cAMP intracellular signalling interaction. *Eur J Pharmacol* 788:255-260. doi:10.1016/j.ejphar.2016.06.034
2. Bhat S, Dao DT, Terrillion CE, Arad M, Smith RJ, Soldatov NM, Gould TD (2012) CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Prog Neurobiol* 99 (1):1-14. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.06.001
3. Zamponi GW (2016) Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. *Nat Rev Drug Discov* 15 (1):19-34. doi:10.1038/nrd.2015.5
4. Bourinet E, Zamponi GW (2016) Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.10.016
5. Jones BL, Smith SM (2016) Calcium-Sensing Receptor: A Key Target for Extracellular Calcium Signaling in Neurons. *Front Physiol* 7:116. doi:10.3389/fphys.2016.00116
6. Chakroborty S, Stutzmann GE (2014) Calcium channelopathies and Alzheimer's disease: insight into therapeutic success and failures. *Eur J Pharmacol* 739:83-95. doi:10.1016/j.ejphar.2013.11.012
7. Felix R (2006) Calcium channelopathies. *Neuromolecular Med* 8 (3):307-318. doi:10.1385/NMM:8:3:307
8. Fairless R, Williams SK, Diem R (2014) Dysfunction of neuronal calcium signalling in neuroinflammation and neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 357 (2):455-462. doi:10.1007/s00441-013-1758-8
9. Hopp SC, D'Angelo HM, Royer SE, Kaercher RM, Crockett AM, Adzovic L, Wenk GL (2015) Calcium dysregulation via L-type voltage-dependent calcium channels and ryanodine receptors underlies memory deficits and synaptic dysfunction during chronic neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 12:56. doi:10.1186/s12974-015-0262-3
10. Huang BR, Chang PC, Yeh WL, Lee CH, Tsai CF, Lin C, Lin HY, Liu YS, Wu CY, Ko PY, Huang SS, Hsu HC, Lu DY (2014) Anti-neuroinflammatory effects of the calcium channel blocker nifedipine on microglial cells: implications for neuroprotection. *PLoS One* 9 (3):e91167. doi:10.1371/journal.pone.0091167
11. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L (2017) Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 13 (1):25-36. doi:nrneurol.2016.187

12. Giovannoni G, Butzkueven H, Dhib-Jalbut S, Hobart J, Kobelt G, Pepper G, Sormani MP, Thalheim C, Traboulsee A, Vollmer T (2016) Brain health: time matters in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 9 Suppl 1:S5-S48. doi:10.1016/j.msard.2016.07.003
13. Dendrou CA, McVean G, Fugger L (2016) Neuroinflammation - using big data to inform clinical practice. *Nat Rev Neurol* 12 (12):685-698. doi:10.1038/nrneurol.2016.171
14. Farjam M, Zhang GX, Ciric B, Rostami A (2015) Emerging immunopharmacological targets in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 358 (1-2):22-30. doi:10.1016/j.jns.2015.09.346
15. Mandolesi G, Gentile A, Musella A, Fresegna D, De Vito F, Bullitta S, Sepman H, Marfia GA, Centonze D (2015) Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 11 (12):711-724. doi:10.1038/nrneurol.2015.222
16. O'Connell K, Kelly SB, Fogarty E, Duggan M, Buckley L, Hutchinson M, McGuigan C, Tubridy N (2014) Economic costs associated with an MS relapse. *Mult Scler Relat Disord* 3 (6):678-683. doi:10.1016/j.msard.2014.09.002
17. Oliva-Moreno J, Trapero-Bertran M, Pena-Longobardo LM, Del Pozo-Rubio R (2016) The Valuation of Informal Care in Cost-of-Illness Studies: A Systematic Review. *Pharmacoeconomics*. doi:10.1007/s40273-016-0468-y
18. Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM (2013) Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol* 34 (8):410-422. doi:10.1016/j.it.2013.04.006
19. Lopez-Diego RS, Weiner HL (2008) Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary. *Nat Rev Drug Discov* 7 (11):909-925. doi:10.1038/nrd2358
20. Tokuhara N, Namiki K, Uesugi M, Miyamoto C, Ohgoh M, Ido K, Yoshinaga T, Yamauchi T, Kuromitsu J, Kimura S, Miyamoto N, Kasuya Y (2010) N-type calcium channel in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem* 285 (43):33294-33306. doi:10.1074/jbc.M109.089805
21. Schampel A, Volovitch O, Koeniger T, Scholz CJ, Jorg S, Linker RA, Wischmeyer E, Wunsch M, Hell JW, Ergun S, Kuerten S (2017) Nimodipine fosters remyelination in a mouse model of multiple sclerosis and induces microglia-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (16):E3295-E3304. doi:10.1073/pnas.1620052114
22. Pringos E, Vignes M, Martinez J, Rolland V (2011) Peptide neurotoxins that affect voltage-gated calcium channels: a close-up on omega-agatoxins. *Toxins (Basel)* 3 (1):17-42. doi:10.3390/toxins3010017
23. Zhan C, Li C, Wei X, Lu W (2015) Toxins and derivatives in molecular pharmaceuticals: Drug delivery and targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 90:101-118. doi:10.1016/j.addr.2015.04.025

24. Tonello R, Fusi C, Materazzi S, Marone IM, De Logu F, Benemei S, Goncalves MC, Coppi E, Castro-Junior CJ, Gomez MV, Geppetti P, Ferreira J, Nassini R (2017) The peptide Phalpa1beta, from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice. *Br J Pharmacol* 174 (1):57-69. doi:10.1111/bph.13652
25. Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA (2002) Phoneutria nigriventer venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol* 22 (5-6):579-588
26. Tonello R, Rigo F, Gewehr C, Trevisan G, Pereira EM, Gomez MV, Ferreira J (2014) Action of Phalpa1beta, a peptide from the venom of the spider Phoneutria nigriventer, on the analgesic and adverse effects caused by morphine in mice. *J Pain* 15 (6):619-631. doi:10.1016/j.jpain.2014.02.007
27. Rosa F, Trevisan G, Rigo FK, Tonello R, Andrade EL, Cordeiro Mdo N, Calixto JB, Gomez MV, Ferreira J (2014) Phalpa1beta, a peptide from the venom of the spider Phoneutria nigriventer shows antinociceptive effects after continuous infusion in a neuropathic pain model in rats. *Anesth Analg* 119 (1):196-202. doi:10.1213/ANE.0000000000000249
28. Diniz DM, de Souza AH, Pereira EM, da Silva JF, Rigo FK, Romano-Silva MA, Binda N, Castro CJ, Jr., Cordeiro MN, Ferreira J, Gomez MV (2014) Effects of the calcium channel blockers Phalpa1beta and omega-conotoxin MVIIA on capsaicin and acetic acid-induced visceral nociception in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 126:97-102. doi:10.1016/j.pbb.2014.09.017
29. Silva RB, Sperotto ND, Andrade EL, Pereira TC, Leite CE, de Souza AH, Bogo MR, Morrone FB, Gomez MV, Campos MM (2015) Spinal blockage of P/Q- or N-type voltage-gated calcium channels modulates functional and symptomatic changes related to haemorrhagic cystitis in mice. *Br J Pharmacol* 172 (3):924-939. doi:10.1111/bph.12966
30. Nicoletti NF, Erig TC, Zanin RF, Roxo MR, Ferreira NP, Gomez MV, Morrone FB, Campos MM (2017) Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 129:58-67. doi:10.1016/j.toxicon.2017.02.001
31. Duggan PJ, Tuck KL (2015) Bioactive Mimetics of Conotoxins and other Venom Peptides. *Toxins (Basel)* 7 (10):4175-4198. doi:10.3390/toxins7104175
32. Amor S, Baker D (2012) Checklist for reporting and reviewing studies of experimental animal models of multiple sclerosis and related disorders. *Mult Scler Relat Disord* 1 (3):111-115. doi:10.1016/j.msard.2012.01.003
33. Dutra RC, Bento AF, Leite DF, Manjavachi MN, Marcon R, Bicca MA, Pesquero JB, Calixto JB (2013) The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by

experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: evidence for the involvement of astrocytes. *Neurobiol Dis* 54:82-93. doi:10.1016/j.nbd.2013.02.007

34. Thell K, Hellinger R, Sahin E, Michenthaler P, Gold-Binder M, Haider T, Kuttke M, Liutkeviciute Z, Goransson U, Grundemann C, Schabbauer G, Gruber CW (2016) Oral activity of a nature-derived cyclic peptide for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (15):3960-3965. doi:10.1073/pnas.1519960113

35. Hylden JL, Wilcox GL (1980) Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67 (2-3):313-316. doi:0014-2999(80)90515-4

36. Hou H, Cao R, Miao J, Sun Y, Liu X, Song X, Guo L (2016) Fingolimod ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting Akt-mTOR axis in mice. *Int Immunopharmacol* 30:171-178. doi:10.1016/j.intimp.2015.11.024

37. Maciel IS, Azevedo VM, Pereira TC, Bogo MR, Souza AH, Gomez MV, Campos MM (2014) The spinal inhibition of N-type voltage-gated calcium channels selectively prevents scratching behavior in mice. *Neuroscience* 277:794-805. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.065

38. Quancard J, Bollbuck B, Janser P, Angst D, Berst F, Buehlmayer P, Streiff M, Beerli C, Brinkmann V, Guerini D, Smith PA, Seabrook TJ, Traebert M, Seuwen K, Hersperger R, Bruns C, Bassilana F, Bigaud M (2012) A potent and selective S1P(1) antagonist with efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Chem Biol* 19 (9):1142-1151. doi:10.1016/j.chembiol.2012.07.016

39. Quintao NL, Passos GF, Medeiros R, Paszcuk AF, Motta FL, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB (2008) Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* 28 (11):2856-2863. doi:10.1523/JNEUROSCI.4389-07.2008

40. Tsagareli MG, Tsiklauri N, Nozadze I, Gurtskaia G (2012) Tolerance effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs microinjected into central amygdala, periaqueductal grey, and nucleus raphe: Possible cellular mechanism. *Neural Regen Res* 7 (13):1029-1039. doi:10.3969/j.issn

41. Dutra RC, Moreira EL, Alberti TB, Marcon R, Prediger RD, Calixto JB (2013) Spatial reference memory deficits precede motor dysfunction in an experimental autoimmune encephalomyelitis model: the role of kallikrein-kinin system. *Brain Behav Immun* 33:90-101. doi:10.1016/j.bbi.2013.06.002

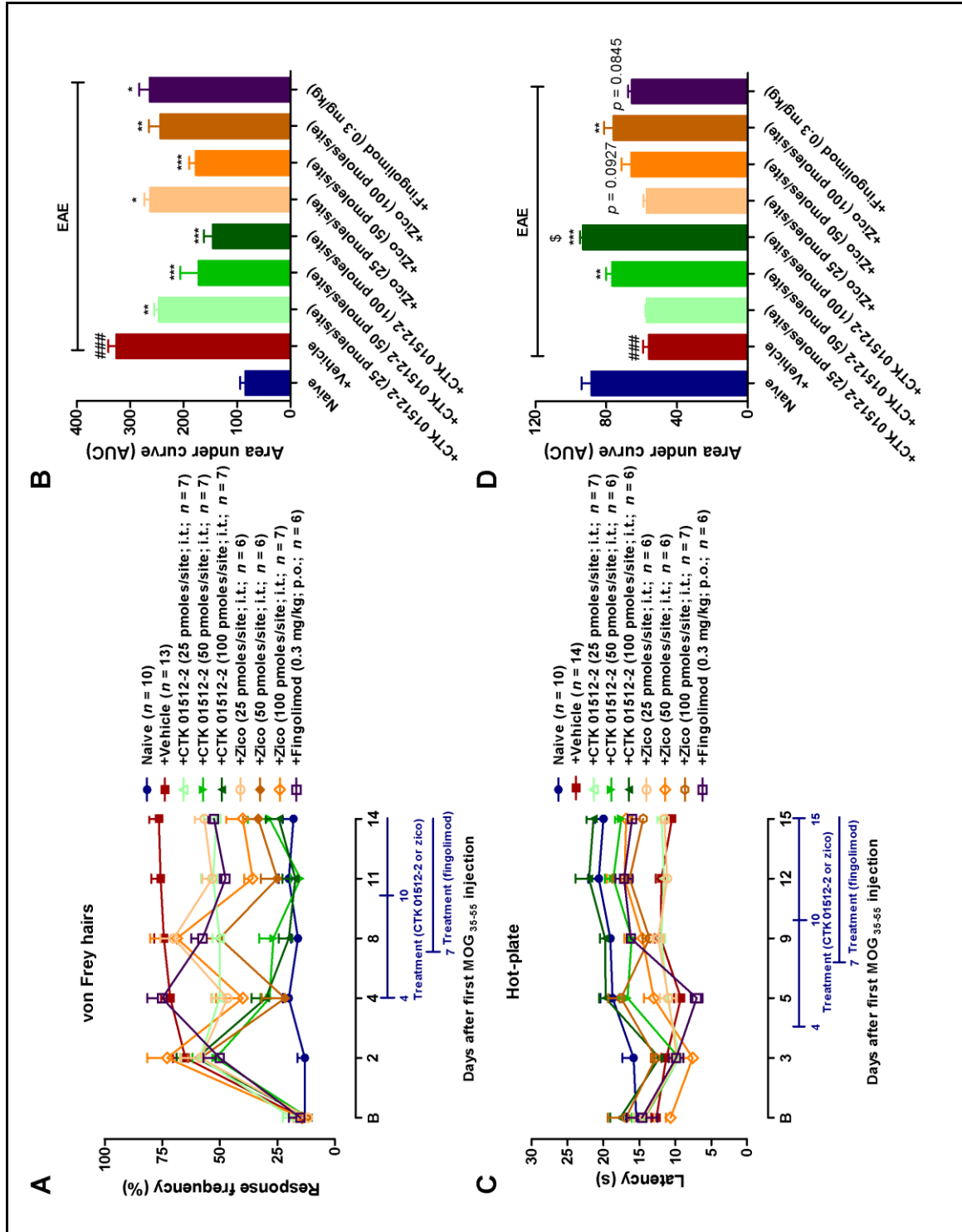
42. Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN (2009) Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Res* 204 (1):206-211. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.005
43. Fernandes ES, Passos GF, Campos MM, de Souza GE, Fittipaldi JF, Pesquero JL, Teixeira MM, Calixto JB (2005) Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression. *Br J Pharmacol* 146 (2):209-216. doi:10.1038/sj.bjp.0706327
44. Ochoa-Reparaz J, Riccardi C, Rynda A, Jun S, Callis G, Pascual DW (2007) Regulatory T cell vaccination without autoantigen protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178 (3):1791-1799
45. Rynda A, Maddaloni M, Ochoa-Reparaz J, Callis G, Pascual DW (2010) IL-28 supplants requirement for T(reg) cells in protein signal-1-mediated protection against murine experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *PLoS One* 5 (1):e8720. doi:10.1371/journal.pone.0008720
46. Freitas RD, Costa KM, Nicoletti NF, Kist LW, Bogo MR, Campos MM (2016) Omega-3 fatty acids are able to modulate the painful symptoms associated to cyclophosphamide-induced-hemorrhagic cystitis in mice. *The Journal of nutritional biochemistry* 27:219-232. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.09.007
47. Radu CG, Shu CJ, Shelly SM, Phelps ME, Witte ON (2007) Positron emission tomography with computed tomography imaging of neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (6):1937-1942. doi:10.1073/pnas.0610544104
48. Baptista PP, Saur L, Bagatini PB, Greggio S, Venturin GT, Vaz SP, Ferreira Kdos R, Junqueira JS, Lara DR, DaCosta JC, Jeckel CM, Mestriner RG, Xavier LL (2015) Antidepressant Effects of Ketamine Are Not Related to (1)(8)F-FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of Wistar Rats. *Neurochem Res* 40 (6):1153-1164. doi:10.1007/s11064-015-1576-3
49. Chiaravalloti ND, DeLuca J (2008) Cognitive impairment in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 7 (12):1139-1151. doi:10.1016/S1474-4422(08)70259-X
50. Hou H, Cao R, Miao J, Sun Y, Liu X, Song X, Guo L (2016) Fingolimod ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting Akt-mTOR axis in mice. *Int Immunopharmacol* 30:171-178. doi:10.1016/j.intimp.2015.11.024
51. Cassidy RM, Tong Q (2017) Hunger and Satiety Gauge Reward Sensitivity. *Frontiers in endocrinology* 8:104. doi:10.3389/fendo.2017.00104

52. Hutcheson J (2015) Adipokines influence the inflammatory balance in autoimmunity. *Cytokine* 75 (2):272-279. doi:10.1016/j.cyto.2015.04.004
53. Kawachi I, Lassmann H (2017) Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 88 (2):137-145. doi:10.1136/jnnp-2016-313300
54. Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB (2016) Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Frontiers in cell and developmental biology* 4:71. doi:10.3389/fcell.2016.00071
55. Sinmaz N, Nguyen T, Tea F, Dale RC, Brilot F (2016) Mapping autoantigen epitopes: molecular insights into autoantibody-associated disorders of the nervous system. *J Neuroinflammation* 13 (1):219. doi:10.1186/s12974-016-0678-4
56. Sama DM, Norris CM (2013) Calcium dysregulation and neuroinflammation: discrete and integrated mechanisms for age-related synaptic dysfunction. *Ageing research reviews* 12 (4):982-995. doi:10.1016/j.arr.2013.05.008
57. Tian DH, Perera CJ, Apostolopoulos V, Moalem-Taylor G (2013) Effects of vaccination with altered Peptide ligand on chronic pain in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Frontiers in neurology* 4:168. doi:10.3389/fneur.2013.00168
58. Palhares MR, Silva JF, Rezende MJS, Santos DC, Silva-Junior CA, Borges MH, Ferreira J, Gomez MV, Castro-Junior CJ (2017) Synergistic antinociceptive effect of a calcium channel blocker and a TRPV1 blocker in an acute pain model in mice. *Life sciences* 182:122-128. doi:10.1016/j.lfs.2017.06.018
59. Rigo FK, Trevisan G, Rosa F, Dalmolin GD, Otuki MF, Cueto AP, de Castro Junior CJ, Romano-Silva MA, Cordeiro Mdo N, Richardson M, Ferreira J, Gomez MV (2013) Spider peptide Phalpa1beta induces analgesic effect in a model of cancer pain. *Cancer science* 104 (9):1226-1230. doi:10.1111/cas.12209
60. Gong N, Park J, Luo ZD (2017) Injury-induced maladaptation and dysregulation of calcium channel alpha2 delta subunit proteins and its contribution to neuropathic pain development. *Br J Pharmacol*. doi:10.1111/bph.13930
61. Schwartz M, Deczkowska A (2016) Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends Immunol* 37 (10):668-679. doi:10.1016/j.it.2016.08.001
62. Hamalainen P, Rosti-Otajarvi E (2016) Cognitive impairment in MS: rehabilitation approaches. *Acta Neurol Scand* 134 Suppl 200:8-13. doi:10.1111/ane.12650

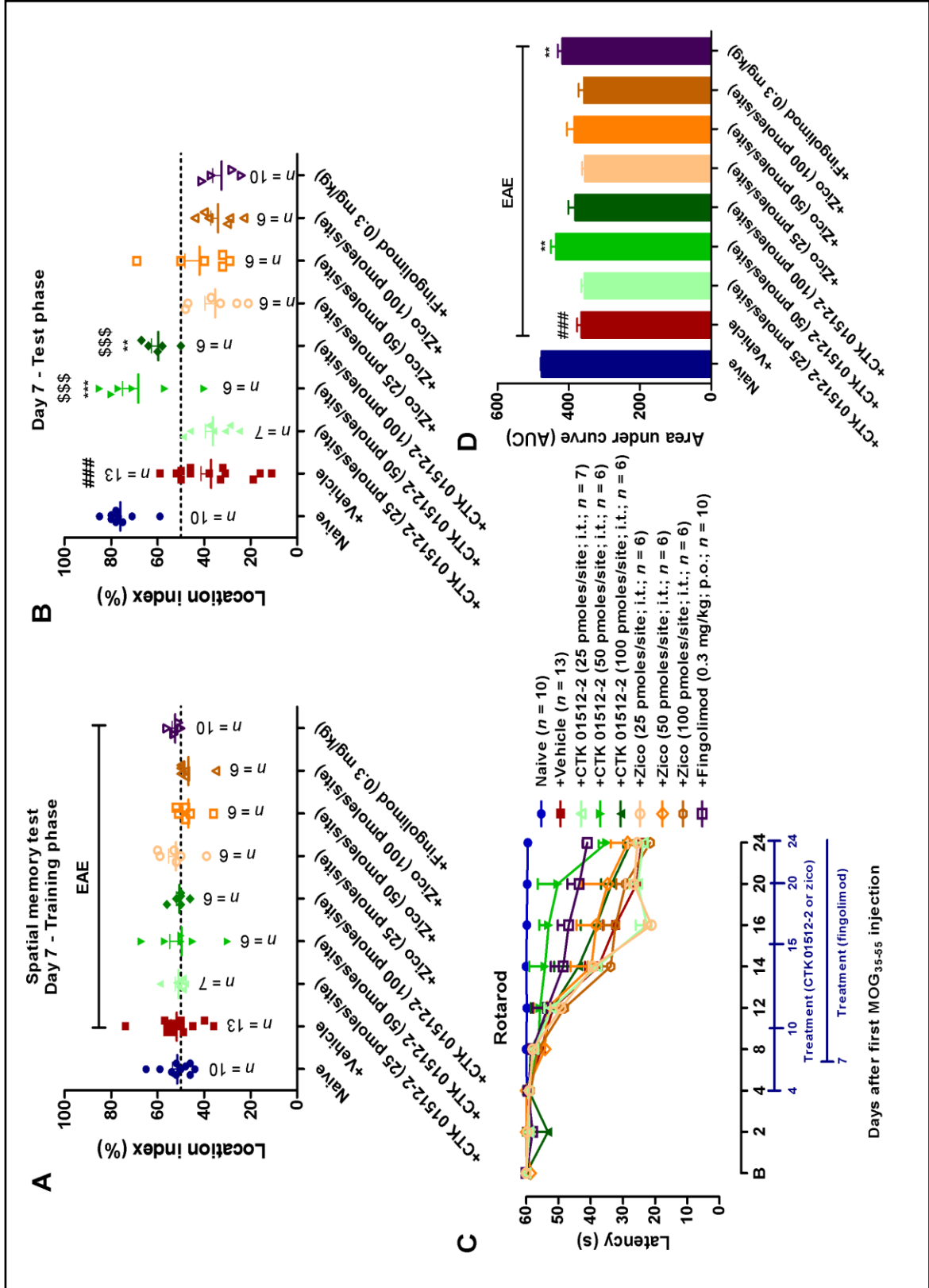


63. Payne C, Wiffen PJ, Martin S (2017) WITHDRAWN: Interventions for fatigue and weight loss in adults with advanced progressive illness. The Cochrane database of systematic reviews 4:CD008427. doi:10.1002/14651858.CD008427.pub3
64. Farrokhi M, Dabirzadeh M, Fadaee E, Beni AA, Saadatpour Z, Rezaei A, Heidari Z (2016) Polymorphism in Leptin and Leptin Receptor Genes May Modify Leptin Levels and Represent Risk Factors for Multiple Sclerosis. *Immunological investigations* 45 (4):328-335. doi:10.3109/08820139.2016.1157811
65. Naylor C, Petri WA, Jr. (2016) Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends in molecular medicine* 22 (2):88-98. doi:10.1016/j.molmed.2015.12.001
66. Becher B, Spath S, Goverman J (2017) Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol* 17 (1):49-59. doi:10.1038/nri.2016.123
67. Perlman S, Zhao J (2017) Roles of regulatory T cells and IL-10 in virus-induced demyelination. *J Neuroimmunol* 308:6-11. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.01.001
68. Balasa RI, Mihaela S, Voidazan S, Barcutean LI, Bajko Z, Hutanu A, Simu I, Maier S (2017) Natalizumab Changes The Peripheral Profile Of The Th17 Panel In Ms Patients: New Mechanisms Of Action. *CNS & neurological disorders drug targets*. doi:10.2174/1871527316666170807130632
69. Luo C, Jian C, Liao Y, Huang Q, Wu Y, Liu X, Zou D, Wu Y (2017) The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatric disease and treatment* 13:1661-1667. doi:10.2147/NDT.S140634
70. Buck D, Forschler A, Lapa C, Schuster T, Vollmar P, Korn T, Nessler S, Stadelmann C, Drzezga A, Buck AK, Wester HJ, Zimmer C, Krause BJ, Hemmer B (2012) 18F-FDG PET detects inflammatory infiltrates in spinal cord experimental autoimmune encephalomyelitis lesions. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 53 (8):1269-1276. doi:10.2967/jnumed.111.102608

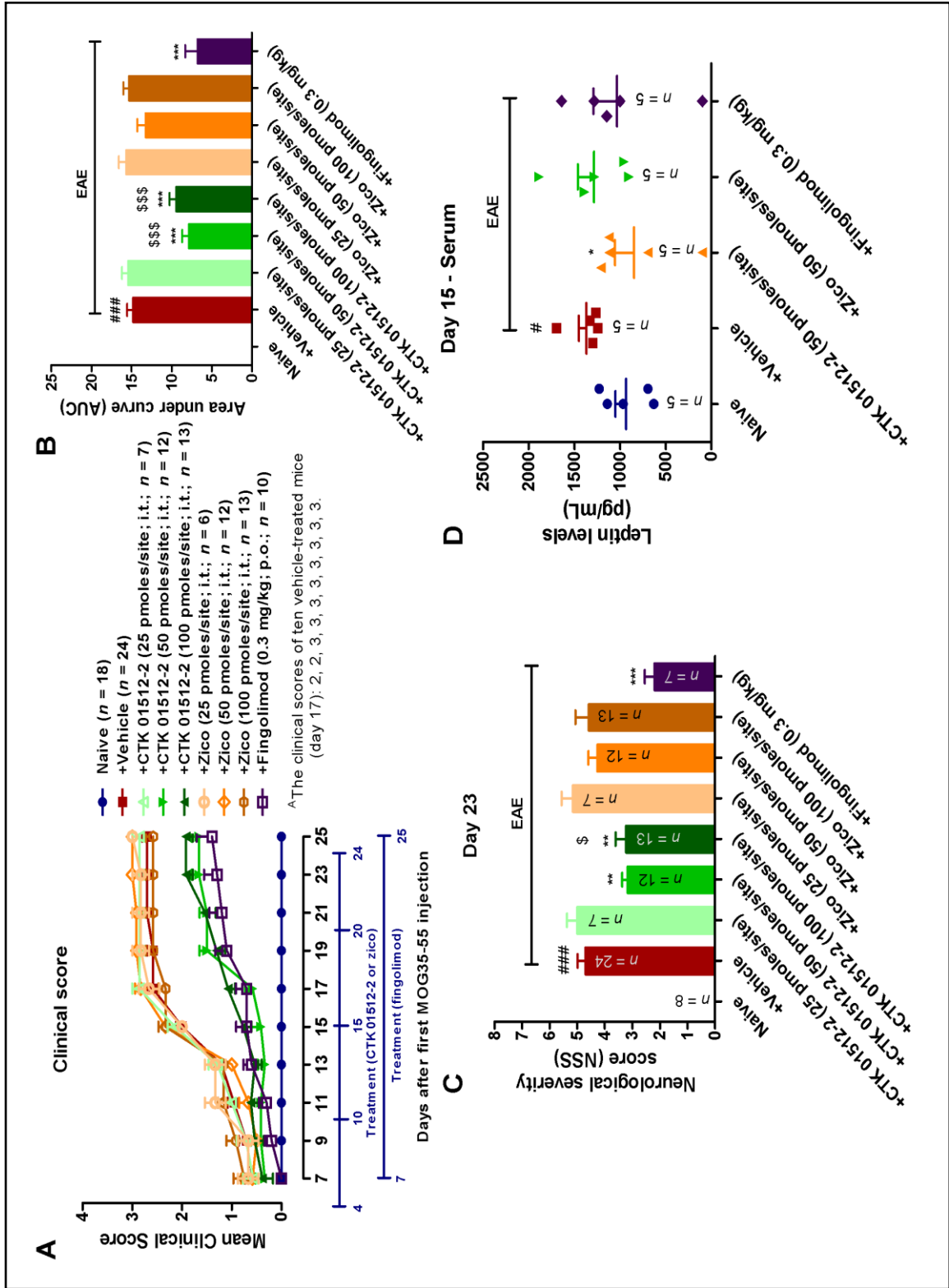
Figures and Legends



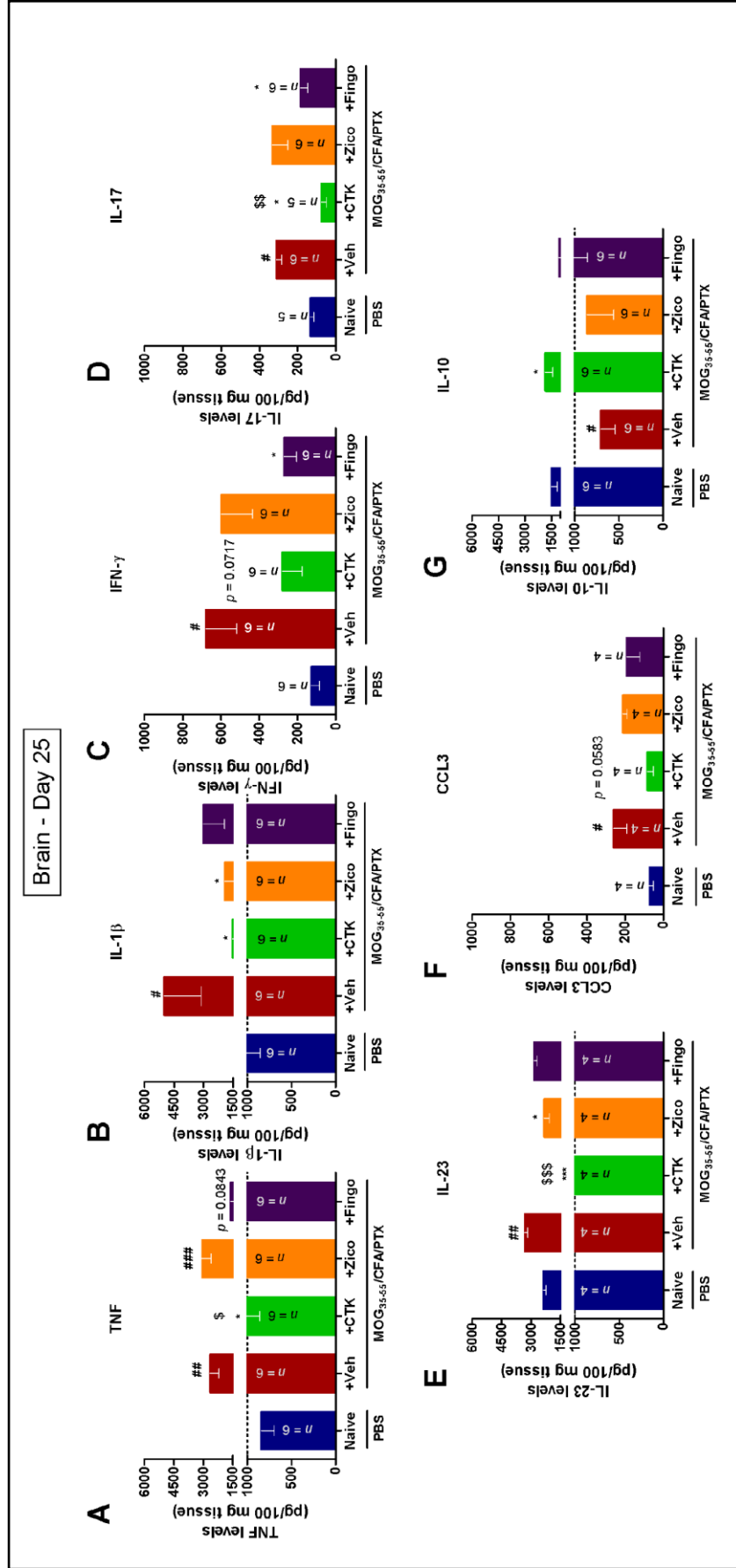
**Fig. 1** Antinociceptive effects of CTK 01512-2, ziconotide and fingolimod in the multiple sclerosis model induced by MOG<sub>35-55</sub> in mice. Effects of treatment with CTK 01512-2, the recombinant form of the peptide Ph $\alpha$ 1 $\beta$  derived from the spider *Phoneutria nigriventer*, ziconotide (Zico) from the cone snail *Conus magus* (25, 50 or 100 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o.), on the mechanical (A and B) and thermal (C and D) hypernociception in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Mechanical (von Frey filaments) and thermal (hot-plate test) hypersensitivity were assessed before (B = baseline) and at the 2<sup>nd</sup>-14<sup>th</sup> and 3<sup>rd</sup>-15<sup>th</sup> days after onset of first MOG<sub>35-55</sub> administration, respectively. Differences in the mechanical and thermal nociception were determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls or Bonferroni post-hoc test. Each column represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs A and C. #### $p < 0.001$  significantly different from naive values. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from vehicle values. \$ $p < 0.05$  significantly different from ziconotide (100 pmoles/site) values. MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein.



**Fig. 2** Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (25, 50 or 100 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o.), on the spatial memory test (A and B) and motor coordination (C and D) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Spatial memory (object location test) and motor coordination (rotarod) were assessed before (training phase; B = baseline) and at the 7<sup>th</sup> and 2<sup>nd</sup>-24<sup>th</sup> days after onset of first MOG<sub>35-55</sub> application, respectively. Differences in the object location and rotarod test were determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls or Bonferroni post-hoc test. Each point represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (A-C). <sup>###</sup> $p < 0.001$  significantly different from naive values. <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  and <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  significantly different from vehicle values. <sup>\$\$\$</sup> $p < 0.001$  significantly different from ziconotide values. MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein

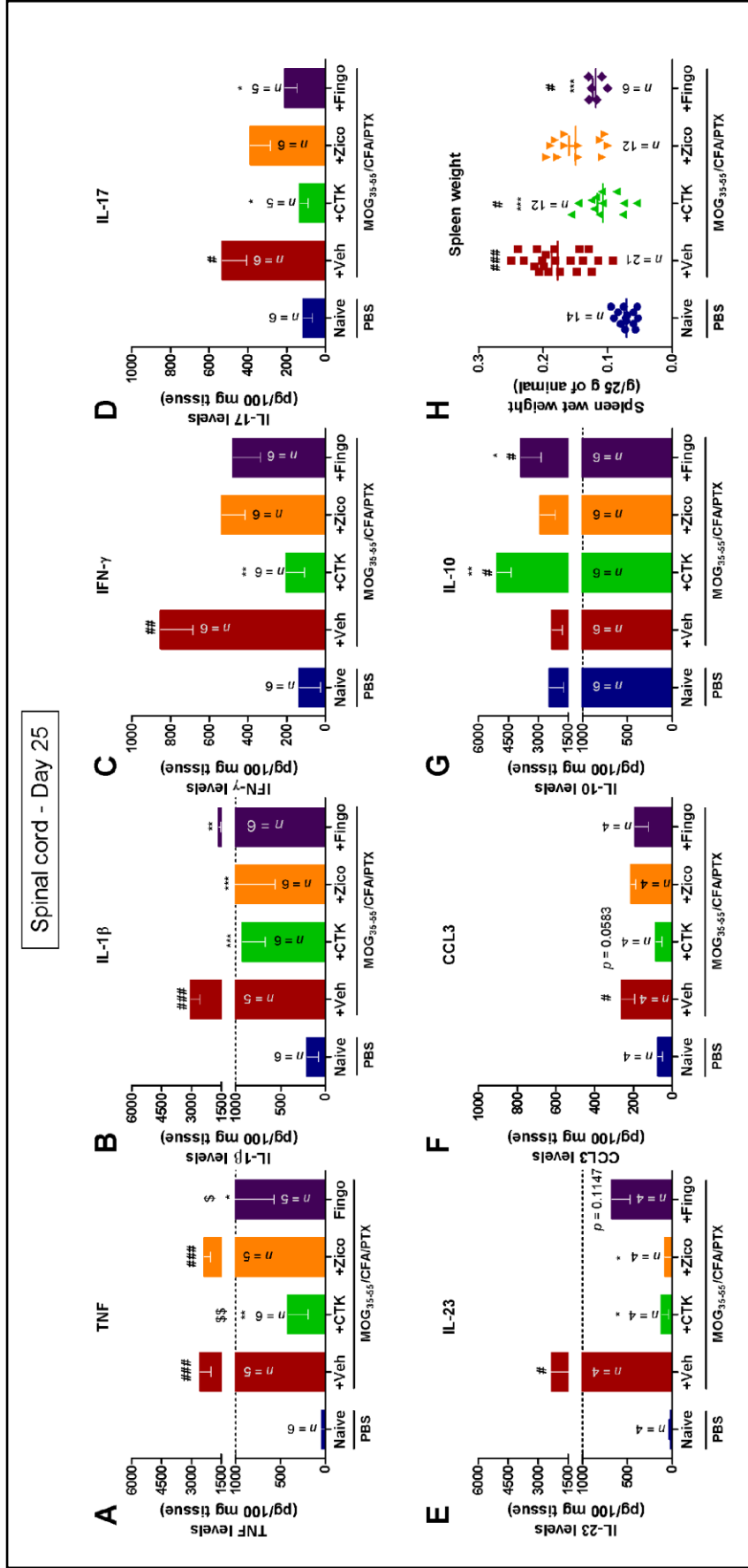


**Fig. 3** Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (25, 50 or 100 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o.), on the clinical score (A and B), neurological severity (C) and leptin levels (D) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Clinical score, neurological severity and leptin levels were evaluated from day 7 to 25, at day 23, or at day 15, respectively, after the first MOG<sub>35-55</sub> injection. Differences in the clinical and neurological scores and leptin levels were determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls or Bonferroni post-hoc test. Each point represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (A, C and D). <sup>A</sup>To show the EAE model reproducibility, we showed ten clinical scores of vehicle-treated mice at onset of chronic phase (day 17). #*p* < 0.05 and ###*p* < 0.001 significantly different from naive values. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 significantly different from vehicle values. \$*p* < 0.05 and \$\$\$*p* < 0.001 significantly different from ziconotide values. MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein.

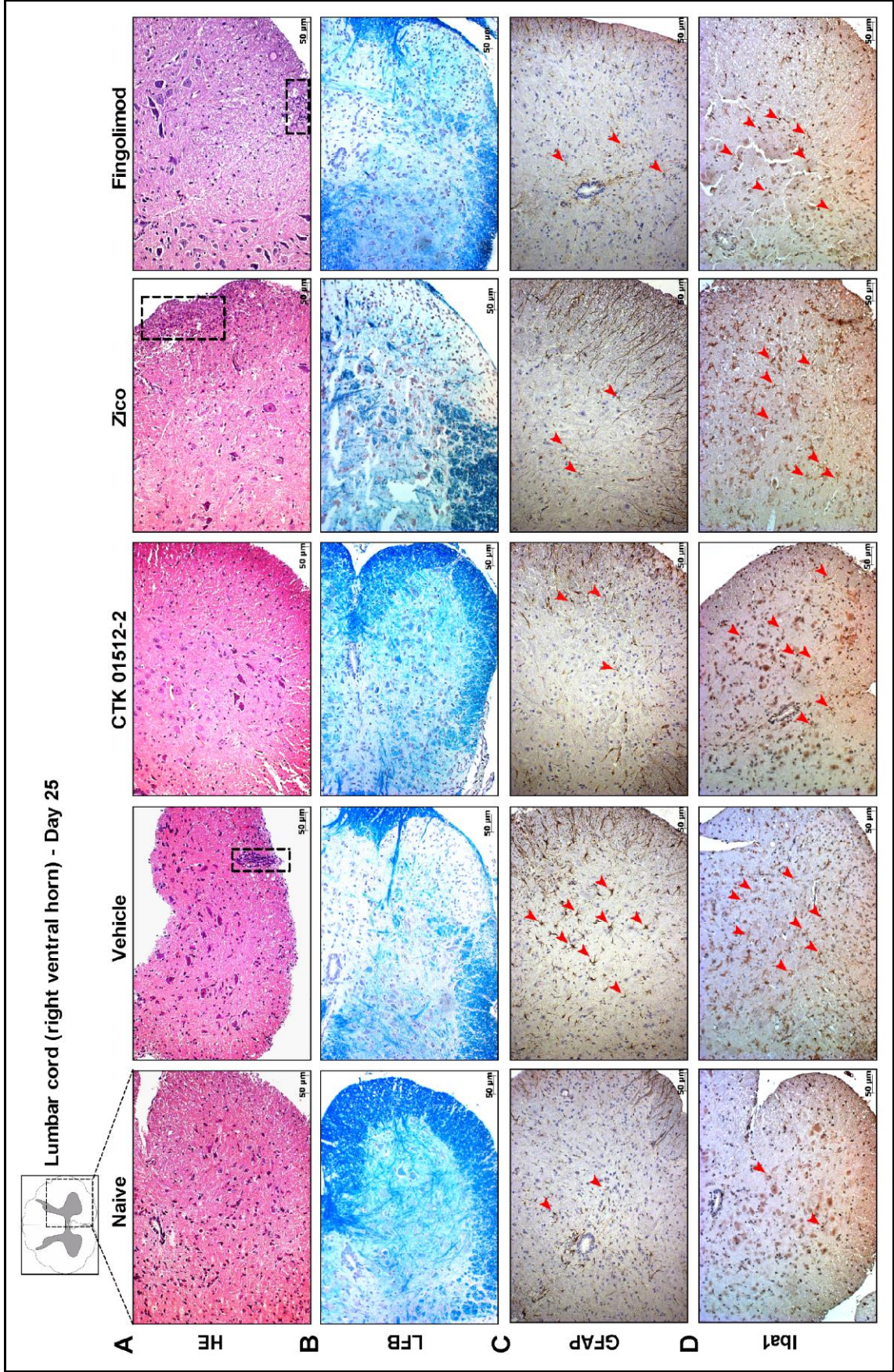




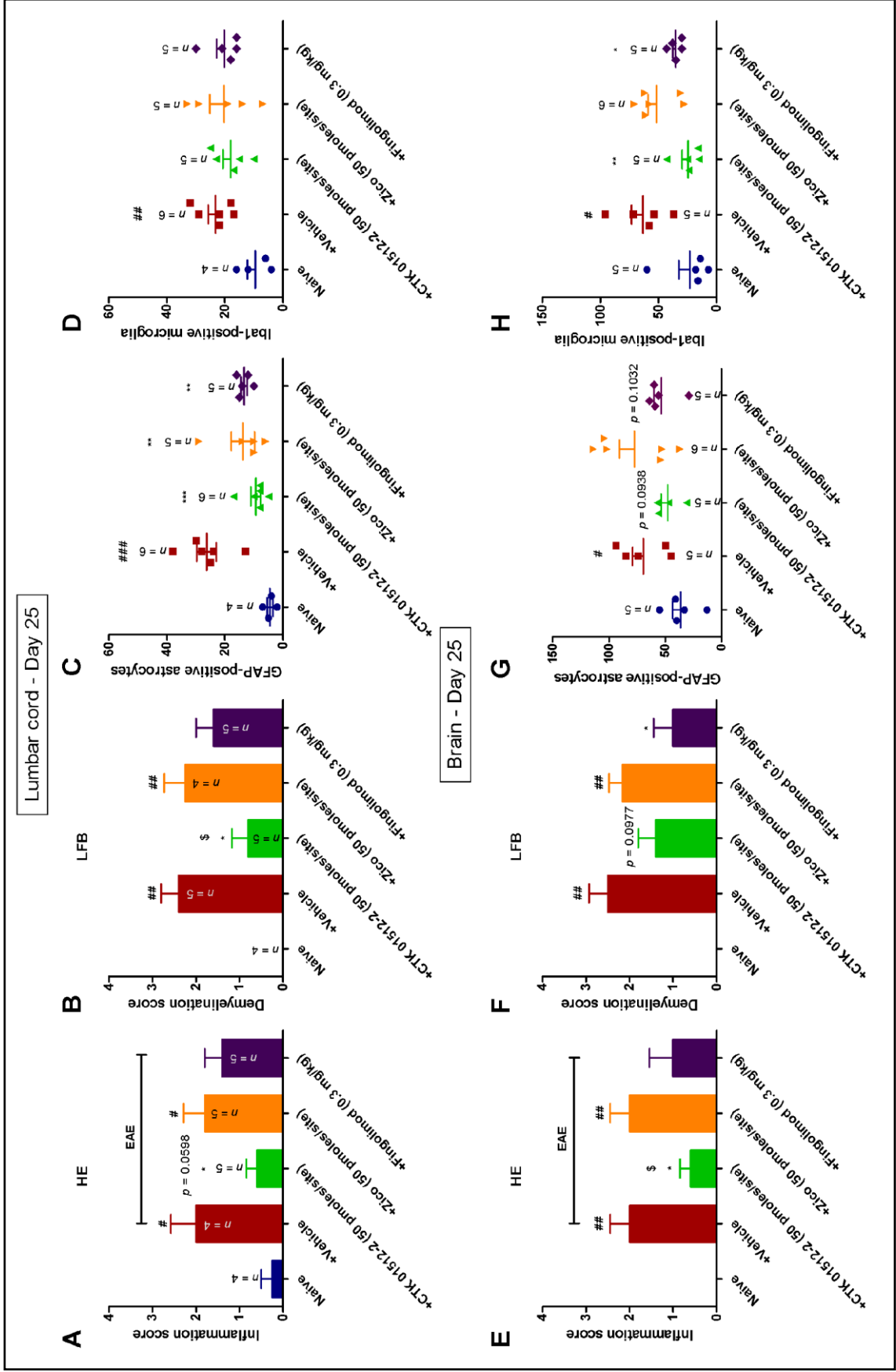
**Fig. 4** Cytokine formation was measured in brain tissues at 25<sup>th</sup> day after subcutaneous administration of MOG<sub>35-55</sub>. Effects of treatment with CTK 01512-2 (CTK), ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (Fingo, 0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o.), on generation of TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), IFN- $\gamma$  (C), IL-17 (D), IL-23 (E), CCL3 (F) and IL-10 (G) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the cytokine production was determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-hoc test. Each point represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (A-G). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  significantly different from naive values. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from vehicle values. \$ $p < 0.05$ , \$\$ $p < 0.01$  and \$\$\$ $p < 0.001$  significantly different from ziconotide values. CCL3 = chemokine (C-C motif) ligand 3; CFA = complete Freund's adjuvant; IFN- $\gamma$  = interferon-gamma; IL = interleukin; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein; PBS = phosphate-buffered saline; PTX = *Pertussis* toxin; TNF = tumor necrosis factor; Veh = vehicle.



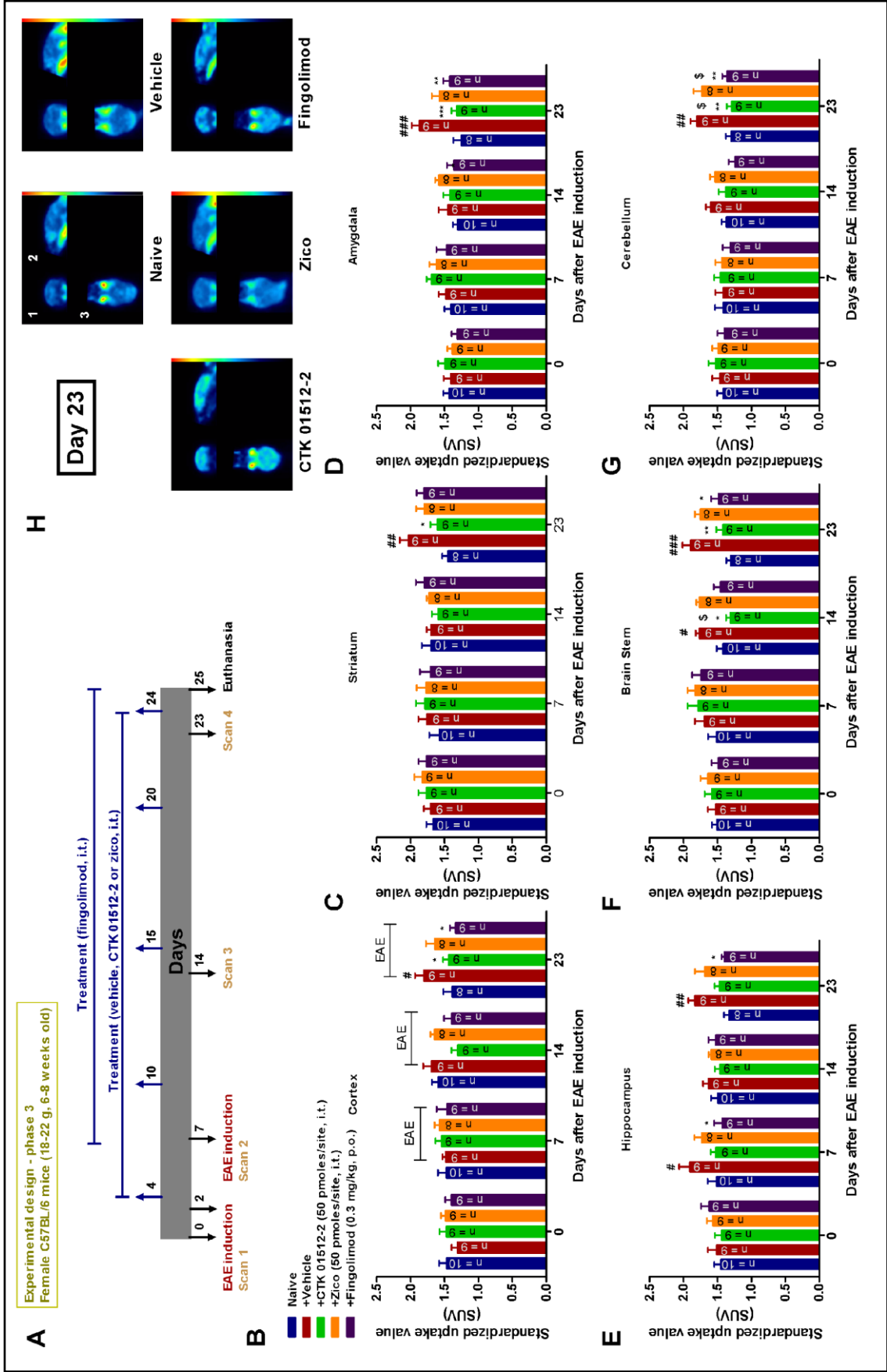
**Fig. 5** MOG<sub>35-55</sub> peptide-induced an increase production of pro-inflammatory cytokines in spinal cord in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice. Effects of treatment with CTK 01512-2 (CTK), ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 days post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (Fingo, 0.3 mg/kg, dosed once a day, starting 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o.), on production of TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), IFN- $\gamma$  (C), IL-17 (D), IL-23 (E), CCL3 (F), IL-10 (G) and spleen wet weight (H) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked EAE in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the cytokine formation was determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-hoc test. Each point represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (A-H). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  significantly different from naive values. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from vehicle values. \$ $p < 0.05$  and \$\$ $p < 0.01$  and significantly different from ziconotide values. CCL3 = chemokine (C-C motif) ligand 3; CFA = complete Freund's adjuvant; IFN- $\gamma$  = interferon-gamma; IL = interleukin; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein; PBS = phosphate-buffered saline; PTX = *Pertussis* toxin; TNF = tumor necrosis factor; Veh = vehicle.



**Fig. 6** Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 days post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o.), on the following parameters: haematoxylin-eosin (HE, inflammation) staining (A), luxol fast blue (LFB, demyelination) staining (B), immunohistochemical for glial fibrillary acidic protein (GFAP, astrocytic marker) (C) and ionized-binding adapter molecule-1 (Iba-1, microglia marker) (D) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Dotted rectangles in the representative images demonstrate the accumulation of inflammatory infiltrate and red arrows indicate the immunopositivity in lumbar cord (right ventral horn). The images were captured in  $\times 200$  magnification. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

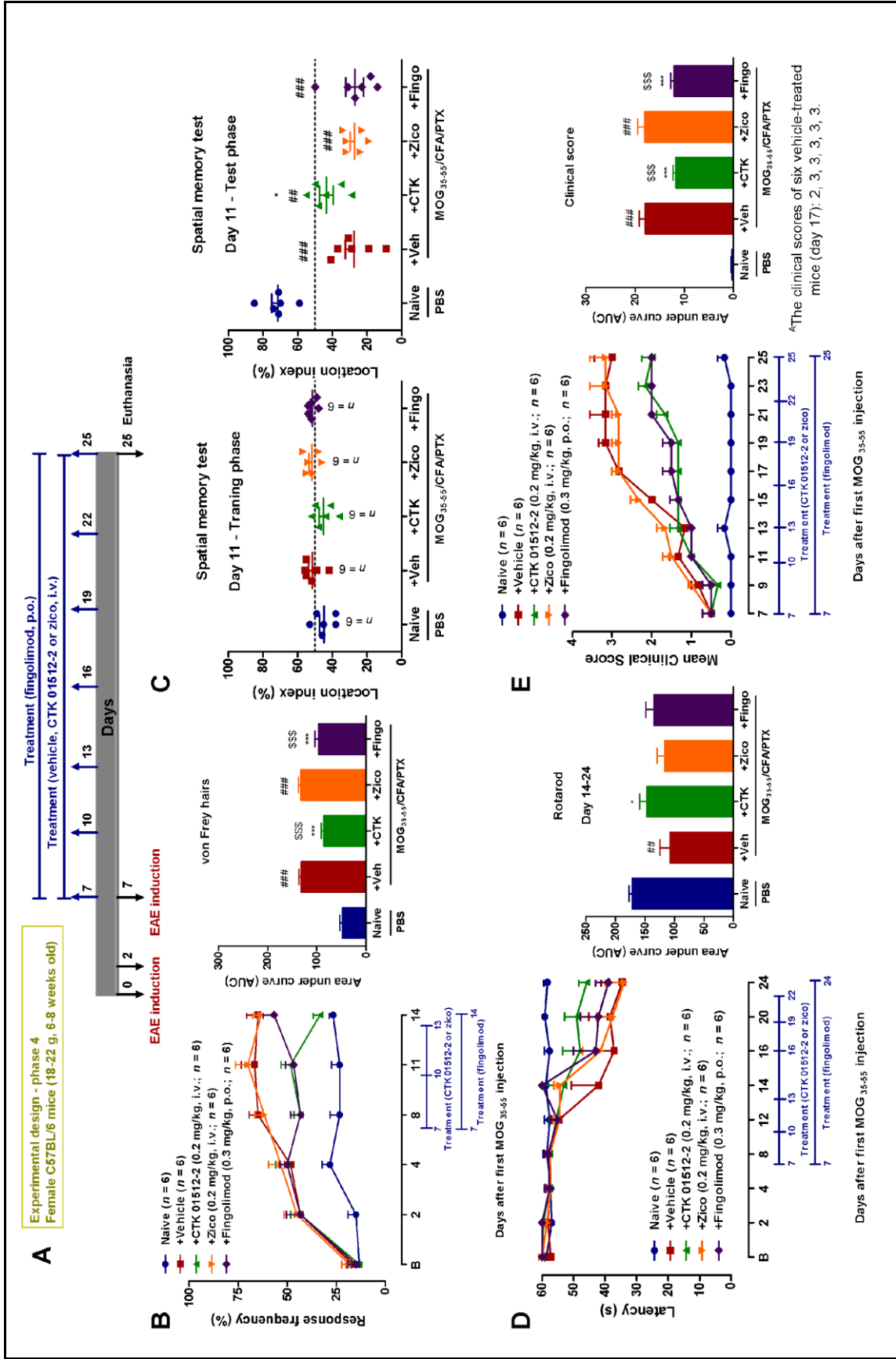


**Fig. 7** CTK 01512-2 modulates MOG<sub>35-55</sub>-induced inflammatory infiltration, demyelination, astrocytic and microglial activation in the mouse brain and lumbar cord after 25 days. Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 days post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o.), on inflammation score (A, E), demyelination score (B, F), immunohistochemical for glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astrocytes (C, G) and ionized-binding adapter molecule-1(Iba1)-positive microglia (D, H) in lumbar spinal cord and brain, respectively, in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the inflammatory score, demyelination score, immunostaining for GFAP and Iba-1 were determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls or Bonferroni post-hoc test. Each point represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (A-H). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  significantly different from naive values. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from vehicle values.

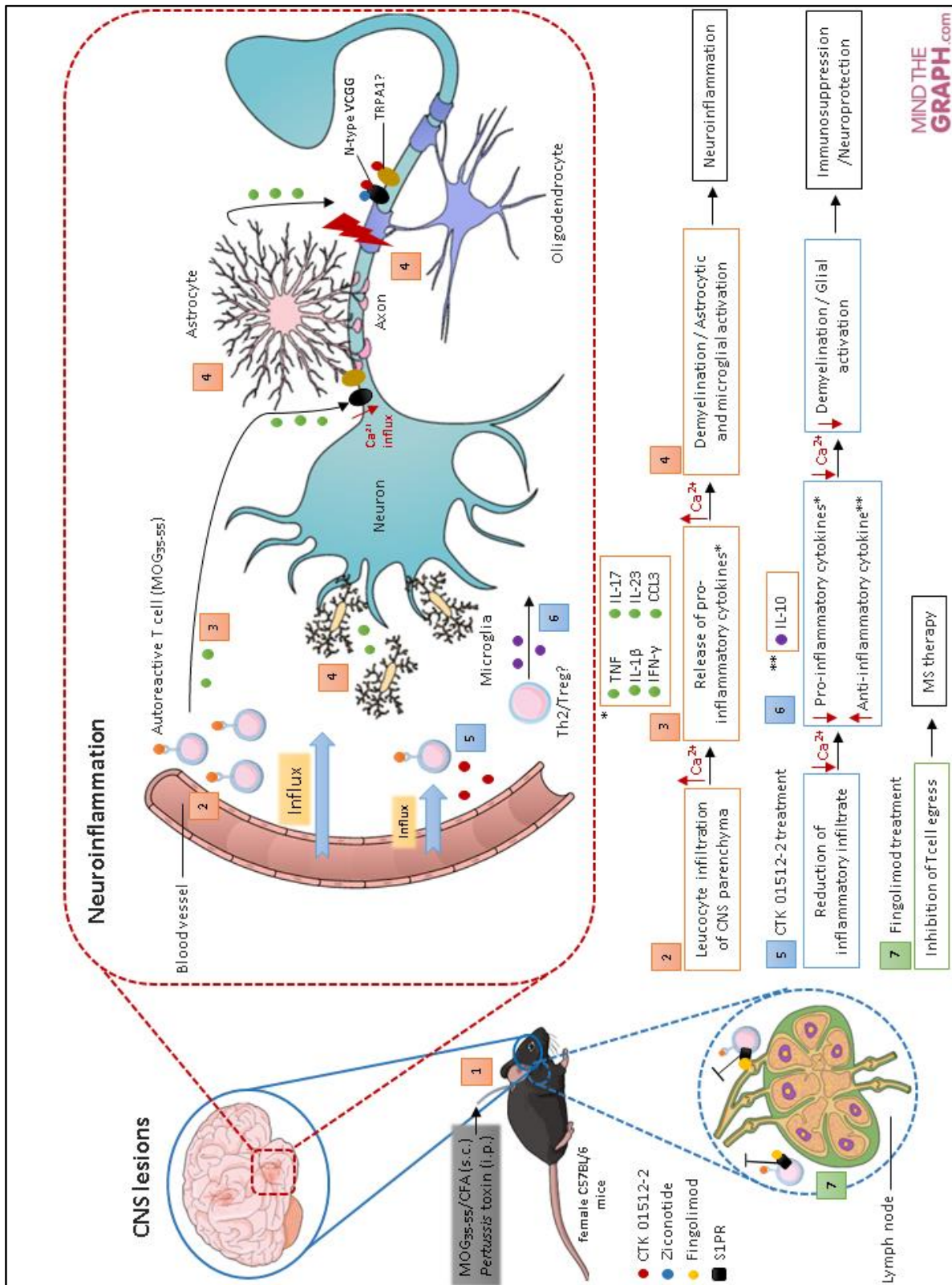




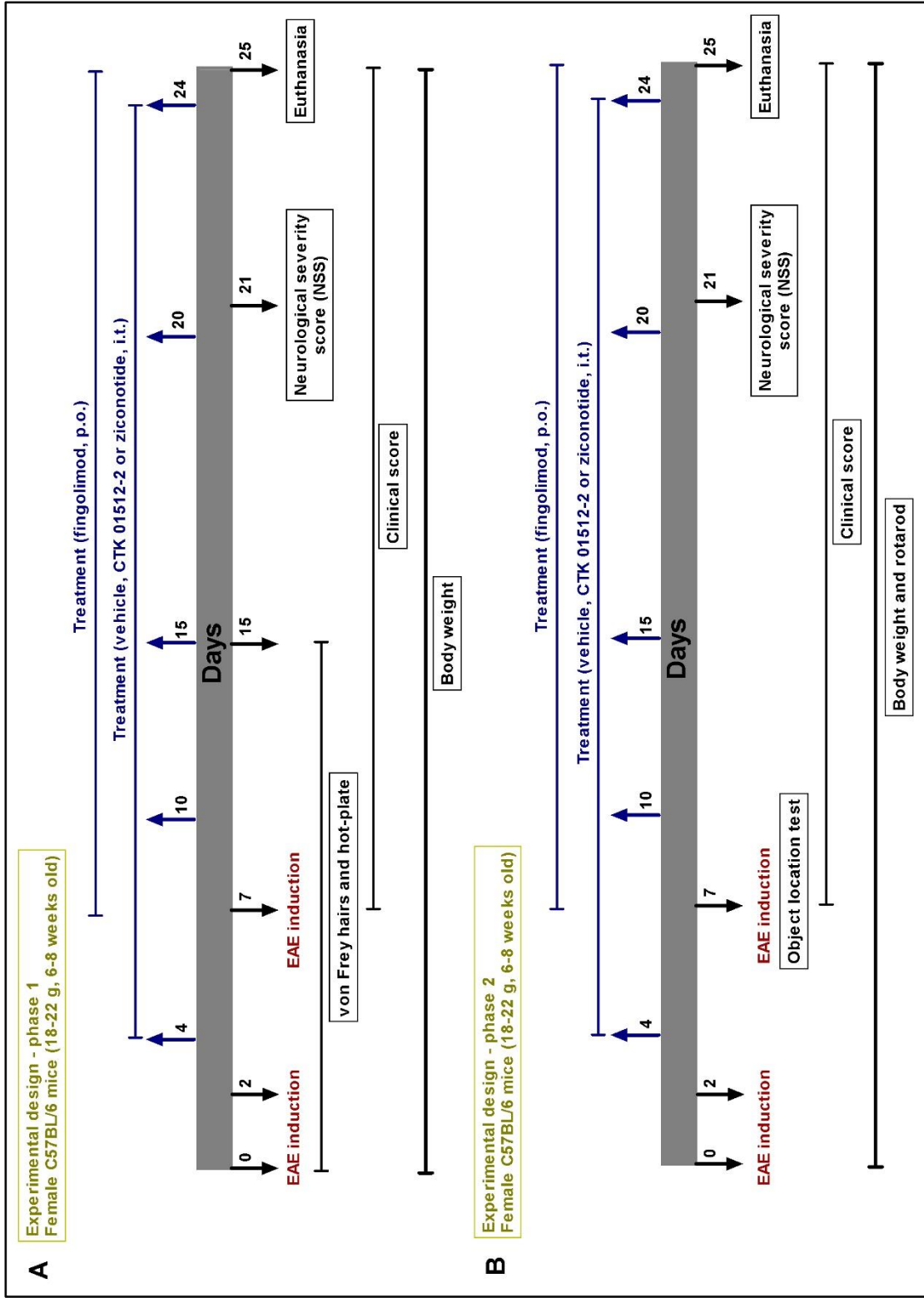
**Fig. 8** Intrathecal CTK 01512-2 reduces the [<sup>18</sup>F]-FDG hypermetabolism associated with MOG<sub>35-55</sub>-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. Schematic representation shows the experimental design for the *in vivo* imaging studies (A) of EAE evoked by MOG<sub>35-55</sub> in female C57BL/6 mice. Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 days post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o), on brain structures: cortex (B), striatum (C), amygdala (D), hippocampus (E), brain stem (F) and cerebellum (G), in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked EAE in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Representative images of coronal (H1), sagittal (H2) and transverse (H3) planes in EAE-affected mice treated with CTK 01512-2, ziconotide or fingolimod 23 days post-MOG<sub>35-55</sub>. Differences in the standardized uptake value (SUV) was determined by two-way analysis of variance. Each column represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (B-G). #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 and ###*p* < 0.001 significantly different from naive values. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 significantly different from vehicle values. \$*p* < 0.05 significantly different from ziconotide values.



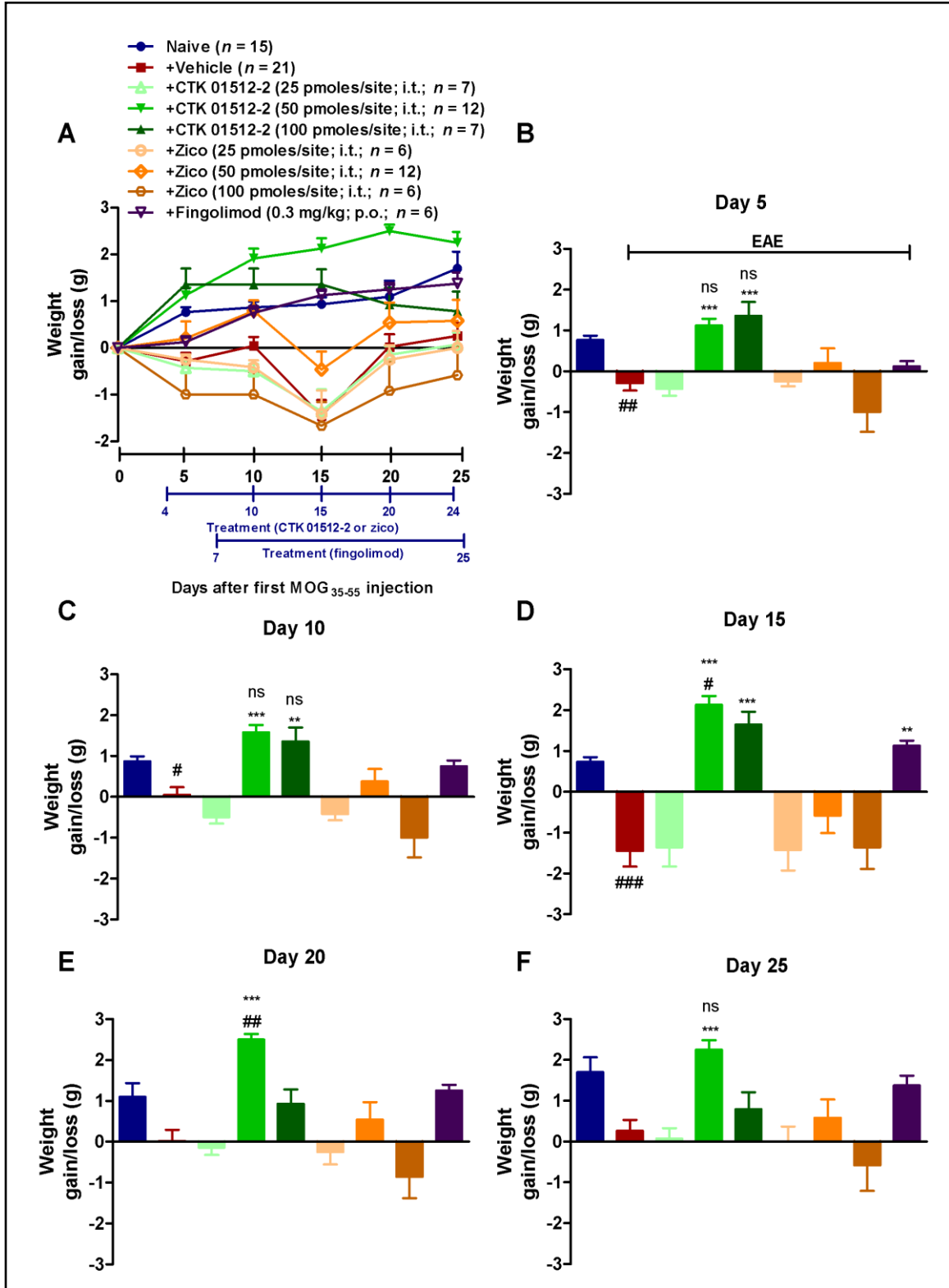
**Fig. 9** Systemic treatment with CTK 01512-2 reduces the symptoms caused by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model in mice. Representative scheme (A) shows the EAE induction during 25 days as well as the respective days of endogenous treatment with vehicle, CTK 01512-2, ziconotide and fingolimod. Effects of treatment with CTK 01512-2 (CTK), ziconotide (Zico) (0,2 mg/kg, every 3 days, starting on day 7, after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), given by intravenous (i.v.) route, or fingolimod (Fingo, 0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days post-MOG<sub>35-55</sub> application), by oral route (p.o.), on the mechanical hypersensitivity (B), spatial memory test (C), motor coordination (D) and clinical score (E) in the model of EAE-affected mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the behavioural tests were determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-hoc test. Each point represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is described in the graphs (A-D). <sup>A</sup>To show the EAE model reproducibility, we showed six clinical scores of vehicle-treated mice at onset of chronic phase (day 17). <sup>##</sup> $p < 0.01$  and <sup>###</sup> $p < 0.001$  significantly different from naive values. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  and <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  significantly different from vehicle values. <sup>\$\$\$</sup> $p < 0.001$  significantly different from ziconotide values. B = baseline withdrawal threshold; CFA = complete Freund's adjuvant; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein; PBS = phosphate-buffered saline; PTX = *Pertussis* toxin; Veh = vehicle.



**Fig. 10** Schematic representation of the neuroinflammatory responses in MOG<sub>35-55</sub>-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice, and the effects of spinal or systemic treatment with recombinant peptide CTK 01512-2, ziconotide or fingolimod (orally). (1) Subcutaneous (s.c.) injection of MOG<sub>35-55</sub>/CFA plus *Pertussis* toxin/PBS (intraperitoneally, i.p.) induces peripheral autoreactive T cells in lymphoid organs. After, blood-brain barrier disruption is necessary to (2) immune cell infiltration into the central nervous system (CNS), in which autoreactive T cells acquire the ability to expand clonally. (3) The white blood cell migration stimulates the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-23 and CCL3. (4) Consequently, these inflammatory mediators increase glial activation (gliosis), including astrocyte and microglia cells. Together, the inflammatory microenvironment promotes (3) axonal damage, leading to CNS demyelination. Oppositely, the blockage of N-type VGCC and/or TRPA1 (?) by CTK 01512-2 diminishes the (5) inflammatory infiltrate, demyelination, leptin levels, the production of pro-inflammatory cytokines, astrocytic and microglial activation, brain glucose hypermetabolism, associated with an increase of the (6) anti-inflammatory cytokine IL-10. CTK 01512-2 effects were mirrored by a reduction of EAE-elicited MS-like symptoms and signals in female C57BL/6 mice. Treatment with the selective N-type VGCC blocker ziconotide failed to attenuate the neuroinflammatory processes. Fingolimod, an antagonist of sphingosine 1-phosphate receptor (S1RP), which inhibits T cell egress, reduced partially these signals and symptoms related to EAE. CCL3 = chemokine (C-C motif) ligand 3; CFA = complete Freund's adjuvant; IFN = interferon; IL = interleukin; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein, TNF = tumor necrosis factor; TRPA1 = transient receptor potential ankyrin 1; VGCC = voltage-gated calcium channel.

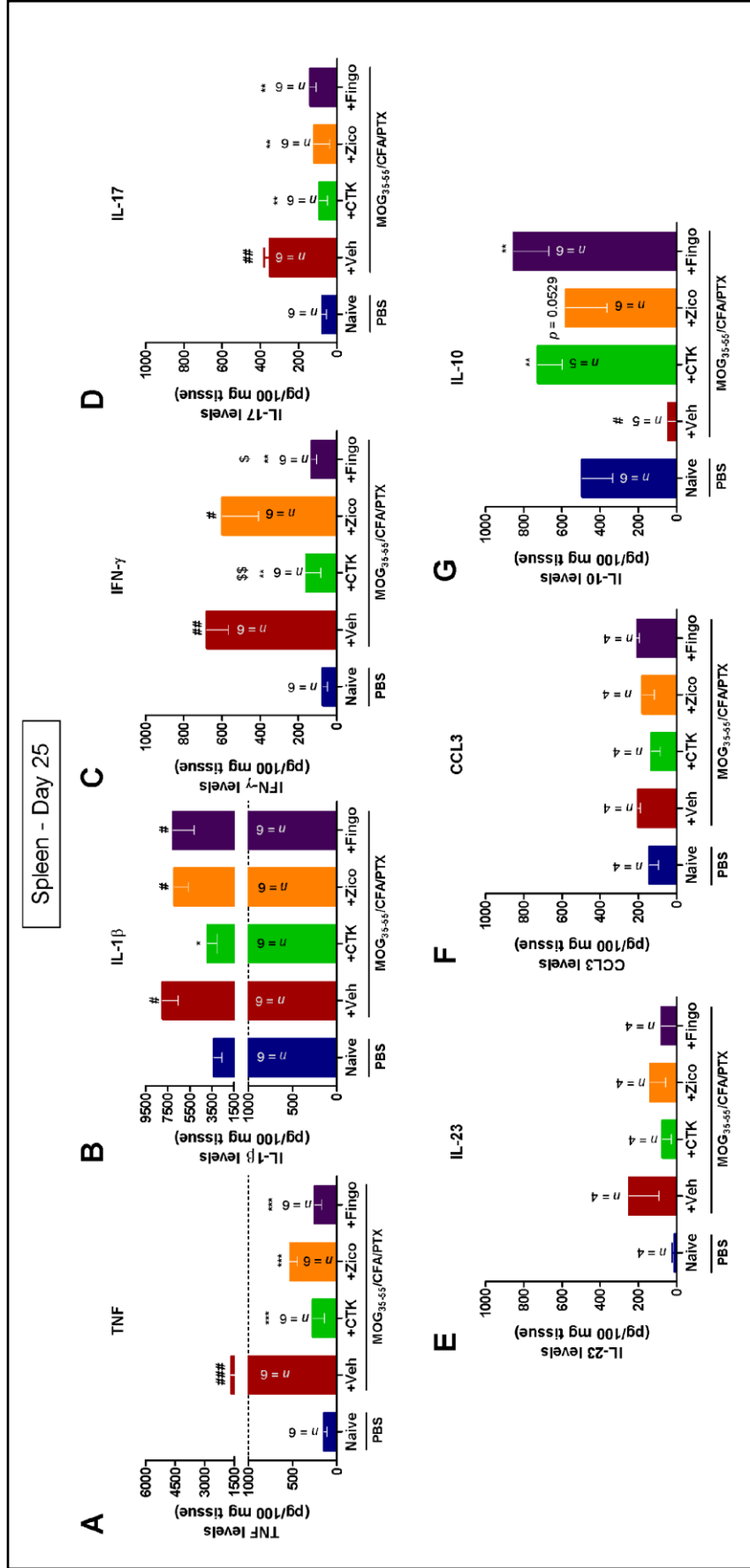


**Supplementary fig. 1** Experimental design phase 1 (A) and phase 2 (B) for the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) evoked by MOG<sub>35-55</sub> in female C57BL/6 mice. Representative scheme (A and B) shows the EAE induction during 25 days as well as the respective days of treatment with vehicle, CTK 01512-2, ziconotide and fingolimod. In experimental design phase 1 shows the behavioural studies performed as von Frey hairs, hot-plate test, clinical score, neurological severity score and body weight during EAE model. In phase 2, the behavioural tests evaluated were object location test, clinical score, neurological severity score, rotarod and body weight.

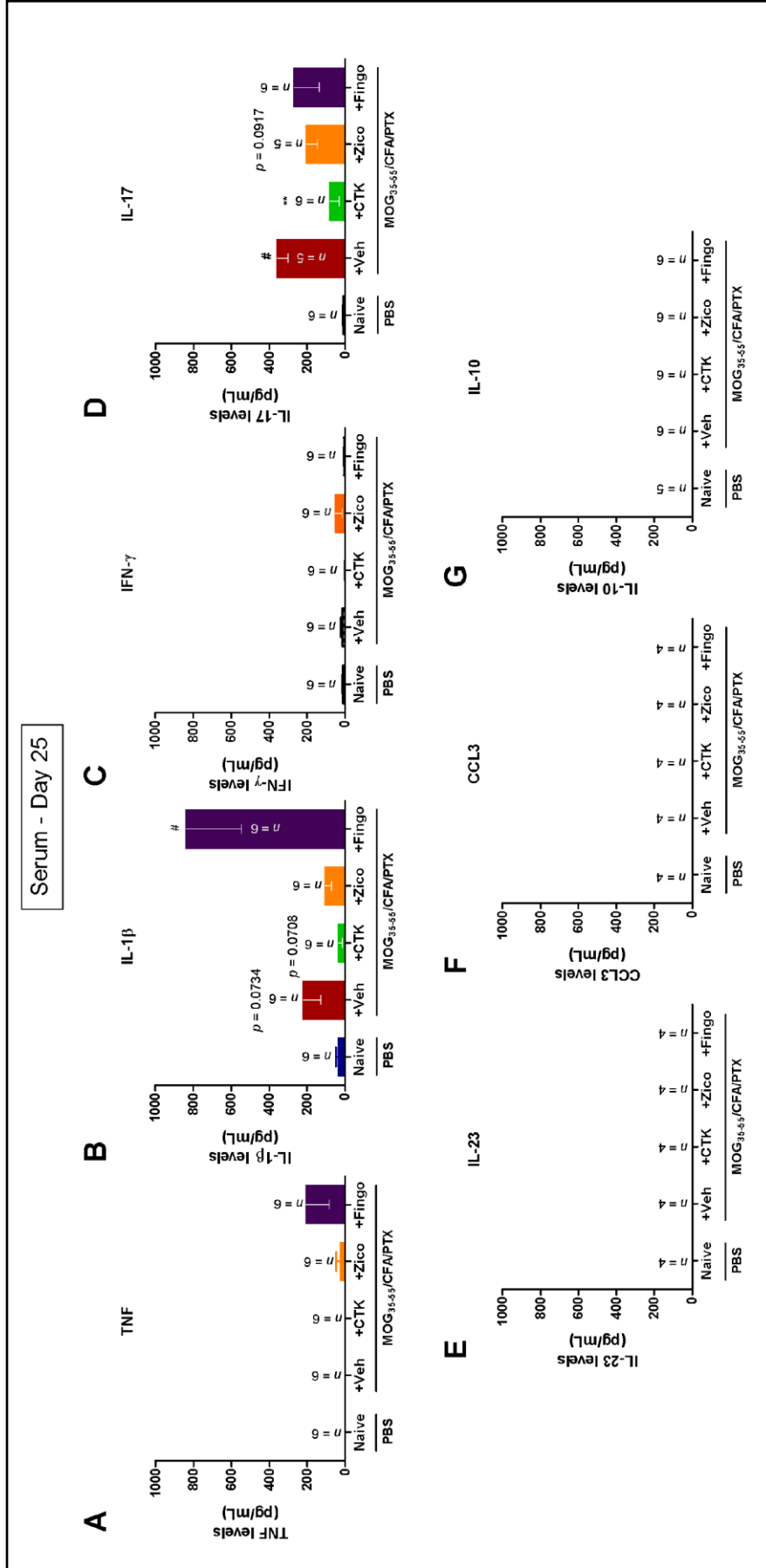




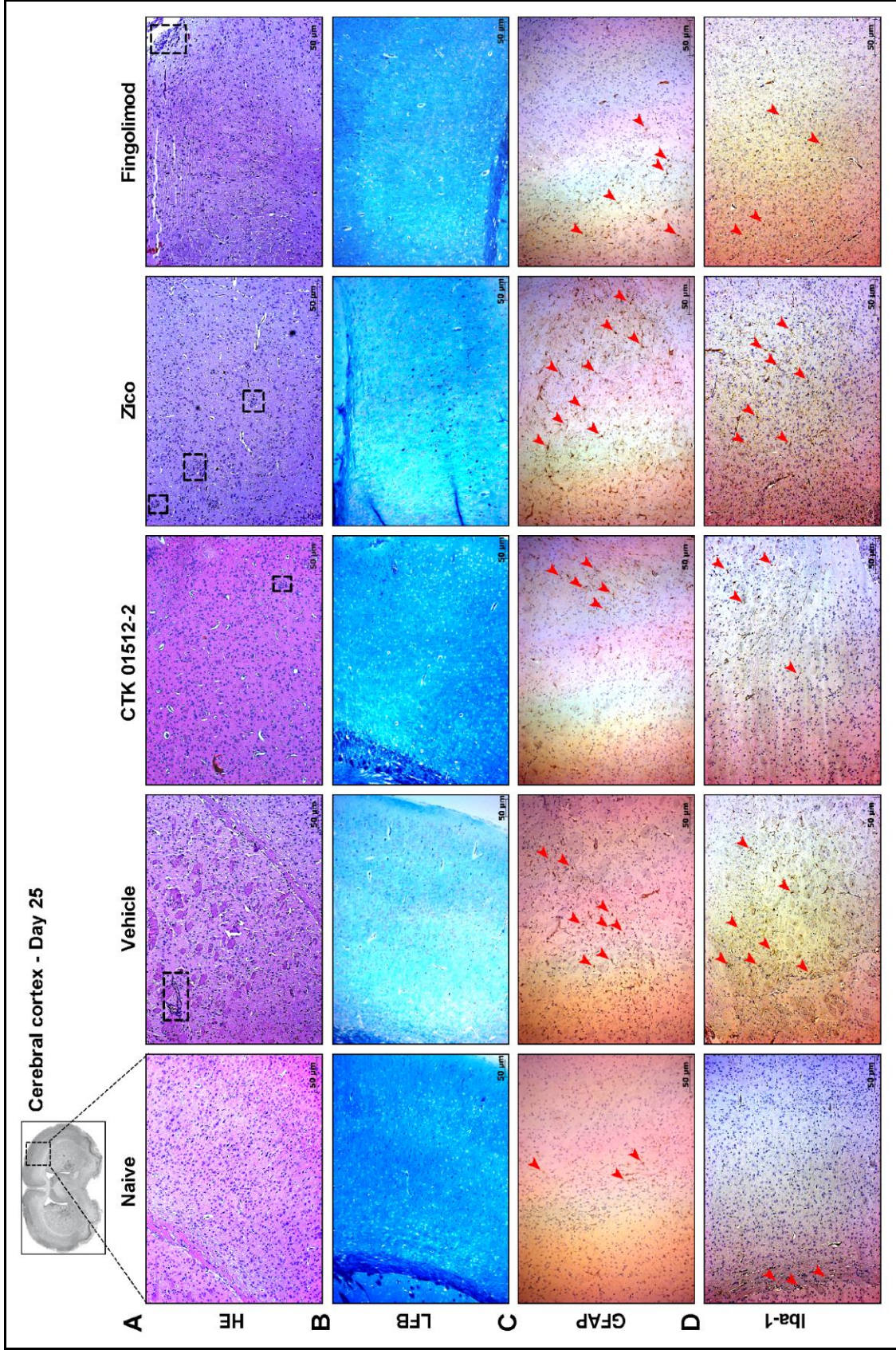
**Supplementary fig. 2** Body weight (gain/loss) was assessed during 25 days after subcutaneous administration of MOG<sub>35-55</sub>. Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (25, 50 or 100 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o.), on body weight (gain/loss) (A) at day 5 (B), day 10 (C), day 15 (D), day 20 (E) and day 25 (F) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the gain and weight loss was determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-hoc test. Each column represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graph A. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  significantly different from naive values. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ . MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein.



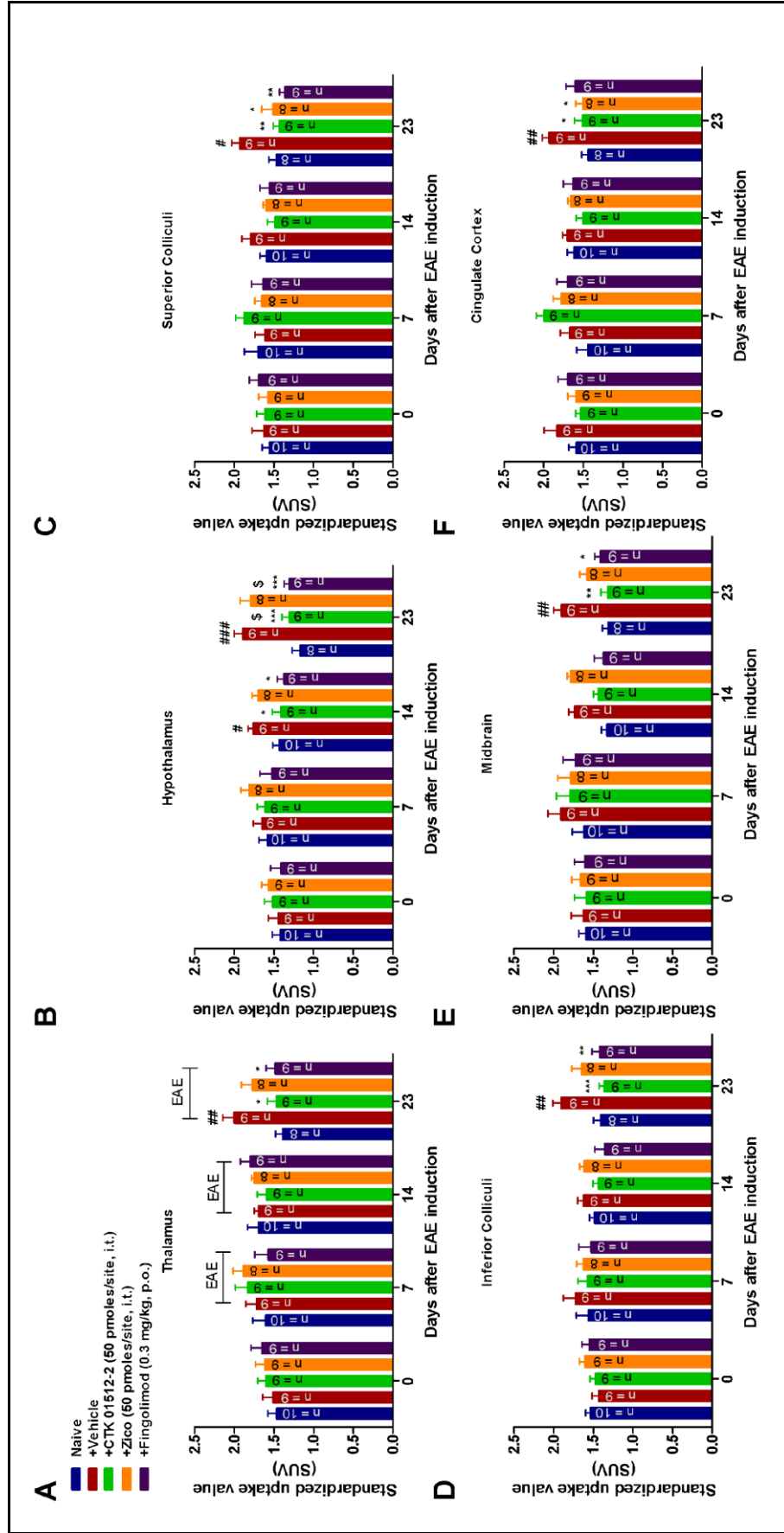
**Supplementary fig. 3** Cytokine production was measured by ELISA in spleen on day 25, after MOG<sub>35-55</sub> elicited multiple sclerosis in mice. Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 days post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o), on production of TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), IFN- $\gamma$  (C), IL-17 (D), IL-23 (E), CCL3 (F) and IL-10 (G) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the cytokine formation was determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-hoc test. Each column represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (A-G). <sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>##</sup> $p < 0.01$  and <sup>###</sup> $p < 0.001$  significantly different from naive values. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from vehicle values. <sup>\$</sup> $p < 0.05$  and <sup>\$\$</sup> $p < 0.01$  and significantly different from ziconotide values. CCL3 = chemokine (C-C motif) ligand 3; CFA = complete Freund's adjuvant; IFN- $\gamma$  = interferon-gamma; IL = interleukin; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein; PBS = phosphate-buffered saline; PTX = *Pertussis* toxin; TNF = tumor necrosis factor; Veh = vehicle.



**Supplementary fig. 4** Cytokine activity was evaluated 25 days after subcutaneous application of MOG<sub>35-55</sub> in serum. Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 days post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o), on production of TNF (A), IL-1 $\beta$  (B), IFN- $\gamma$  (C), IL-17 (D), IL-23 (E), CCL3 (F) and IL-10 (G) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the cytokine production was determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-hoc test. Each column represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (A-G). # $p < 0.05$  significantly different from naive values. \*\* $p < 0.01$  significantly different from vehicle values. CCL3 = chemokine (C-C motif) ligand 3; CFA = complete Freund's adjuvant; IFN- $\gamma$  = interferon-gamma; IL = interleukin; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein; PBS = phosphate-buffered saline; PTX = *Pertussis* toxin; TNF = tumor necrosis factor; Veh = vehicle.

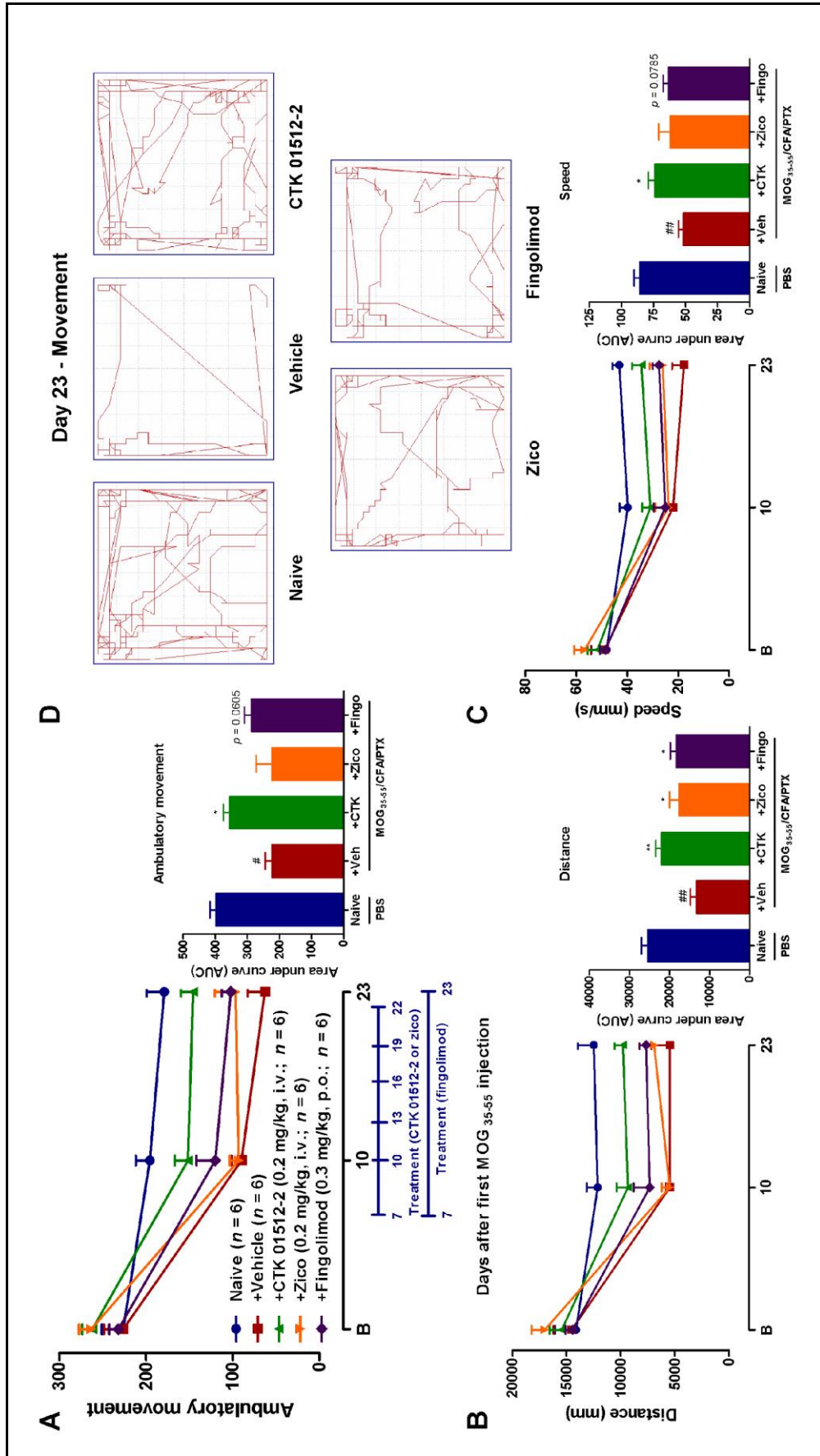


**Supplementary fig. 5** Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 days post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o), on the representative images of haematoxylin-eosin (HE, inflammation) staining (A), luxol fast blue (LFB, demyelination) staining (B), immunohistochemical for glial fibrillary acidic protein (GFAP, astrocytic marker) (C) and ionized-binding adapter molecule 1 (Iba1, microglia marker) (D) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked EAE in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Dotted rectangles demonstrate the accumulation of inflammatory infiltrate and red arrows indicate the immunopositivity in brain (cerebral cortex). The images were captured in  $\times 100$  magnification. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

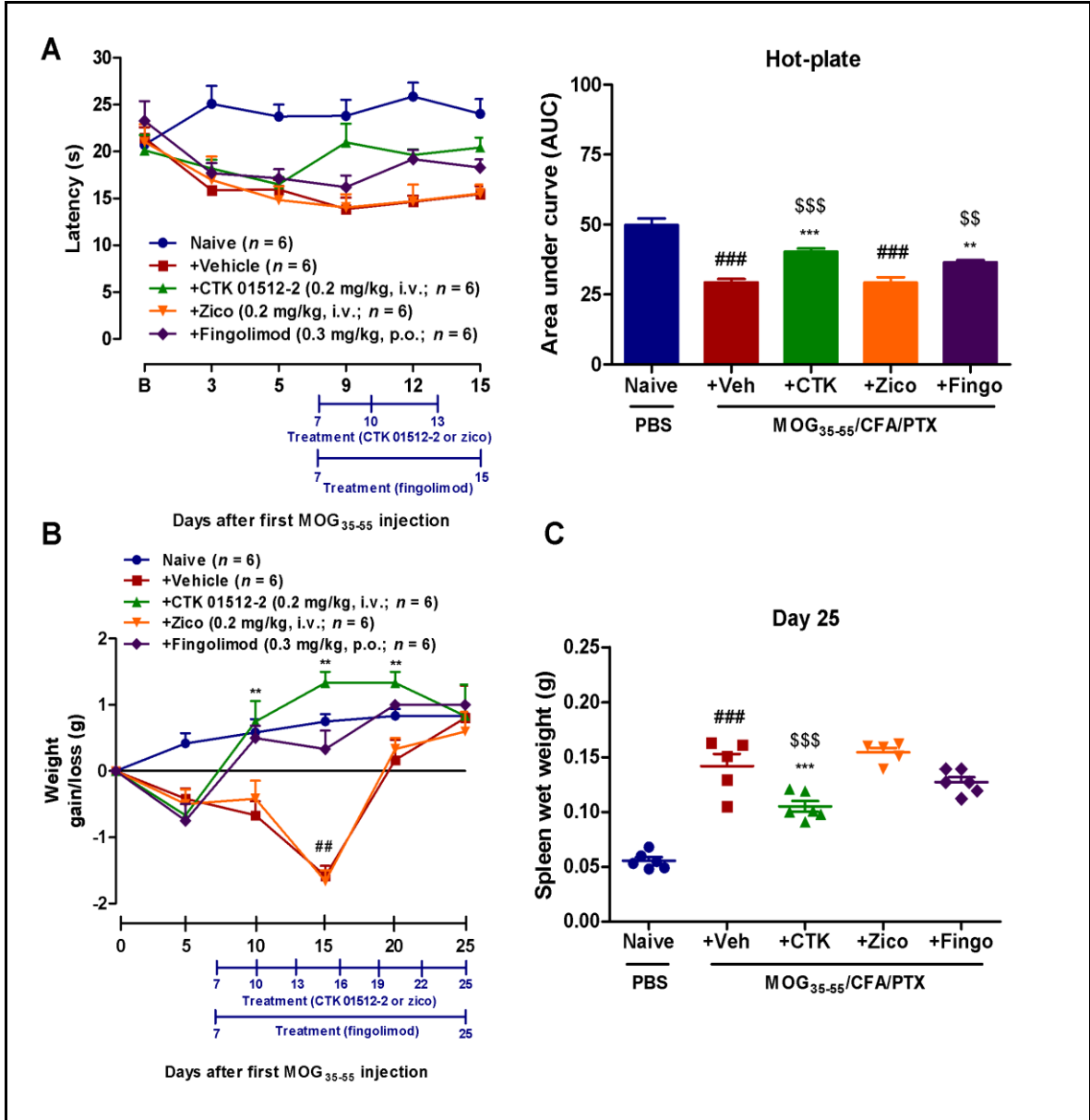




**Supplementary fig. 6** Effects of treatment with CTK 01512-2, ziconotide (Zico) (50 pmoles/site, dosed at days 4, 10, 15, 20 and 24 days post-MOG<sub>35-55</sub>), by intrathecal (i.t.) route, or fingolimod (0.3 mg/kg, dosed once a day, beginning 7 days after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by oral route (p.o), on [<sup>18</sup>F]-FDG metabolism of the following brain regions: thalamus (A), hypothalamus (B), superior colliculi (C), inferior colliculi (D), midbrain (E) and cingulate cortex in the model of MOG<sub>35-55</sub>-evoked experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the standardized uptake value (SUV) was determined by two-way analysis of variance. Each column represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is provided in the graphs (A-F). #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 and ###*p* < 0.001 significantly different from naive values. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 significantly different from vehicle values. \$*p* < 0.05 significantly different from ziconotide values.



**Supplementary fig. 7** Recombinant peptide CTK 01512-2 treatment prevents MOG<sub>35-55</sub>-evoked activity loss in mice. Effects of treatment with CTK 01512-2 (CTK), ziconotide (Zico) (0,2 mg/kg, every 3 days, starting on day 7, after the first MOG<sub>35-55</sub> injection), by intravenous (i.v.) route, or fingolimod (Fingo, 0.3 mg/kg, once a day, beginning 7 days post-MOG<sub>35-55</sub> application) by oral route (p.o.), on the ambulatory movement (A), travelled distance (B) and speed (C) in the model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-affected mice. Representative images of the mouse movements (D) through the arena, 23 days after MOG<sub>35-55</sub> application according to the respective treatments. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the behavioural tests were determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls post-hoc test. Each point represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is described in the graphs (A-C). <sup>#</sup>*p* < 0.05 and <sup>##</sup>*p* < 0.01 significantly different from naive values. \**p* < 0.05 significantly different from vehicle values. B = baseline; CFA = complete Freund's adjuvant; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein; PBS = phosphate-buffered saline; PTX = *Pertussis* toxin; Veh = vehicle.



**Supplementary fig. 8** Effects of treatment with CTK 01512-2 (CTK), ziconotide (Zico) (0,2 mg/kg, every 3 days, starting on day 7, after first MOG<sub>35-55</sub> injection), given by intravenous (i.v.) route, or fingolimod (Fingo, 0.3 mg/kg, once a day, beginning 7 days post-MOG<sub>35-55</sub> application) given by oral route (p.o.), on the thermal nociception (A), body weight (gain/loss) (B) and spleen wet weight (C) in the model of MOG<sub>35-55</sub>-caused experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. Fingolimod was used as a positive control drug for multiple sclerosis treatment. Differences in the hot-plate test, body and spleen weight were determined by one-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls or Bonferroni post-hoc test. Each point represents the mean and the vertical lines show the standard error mean. The experimental N of each group is described in the graphs (A-C). ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  significantly different from naive values. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from vehicle values. \$\$ $p < 0.01$  and \$\$\$ $p < 0.001$  significantly different from ziconotide values. B = baseline; CFA = complete Freund's adjuvant; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein; PBS = phosphate-buffered saline; PTX = *Pertussis* toxin; Veh = vehicle.

**Supplementary table 1. Effects of i.v. administration of CTK 01512-2<sup>§</sup> on several parameters in a mouse model of MS**

<b>EAE model</b>	<b>Naive</b>	<b>+Veh</b>	<b>+ CTK 01512-2 (0.2 mg/kg)</b>	<b>+Zico (0.2 mg/kg)</b>	<b>+Fingo (0.3 mg/kg)</b>
	Mean ± SEM				
Von Frey hair (AUC)	48.33 ± 5.27	131.66 ± 5.11 ###	86.66 ± 4.94 *** / \$\$\$	132.50 ± 5.28 ###	96.66 ± 7.60 *** / \$\$\$
Hot-plate (AUC)	49.80 ± 2.37	29.28 ± 1.22 ###	40.33 ± 1.61 *** / \$\$\$	29.16 ± 2.05 ###	36.42 ± 0.90 ** / \$\$
Rotarod (AUC)	172.00 ± 5.01	107.16 ± 17.34 ##	146.50 ± 12.68 *	116.58 ± 12.60	134.66 ± 14.46
Clinical score (AUC)	0.33 ± 0.21	18.00 ± 1.12 ###	11.75 ± 0.52 *** / \$\$\$	18.08 ± 1.43 ###	12.08 ± 0.70 *** / \$\$\$
Ambulatory movement (AUC)	398.16 ± 18.09	223.35 ± 20.94 #	355.33 ± 20.00 *	223.00 ± 50.53	287.41 ± 21.94 <i>p</i> = 0.0605
Distance (AUC)	25.42 ± 1.52	13.24 ± 1.49 ##	21.95 ± 1.48 **	17.64 ± 2.38 *	18.36 ± 1.46 *
Speed (AUC)	85.52 ± 4.50	51.65 ± 3.88 ##	74.04 ± 4.96 *	61.99 ± 8.96	63.15 ± 4.39 <i>p</i> = 0.0785
Spatial memory test	71.66 ± 3.40	27.66 ± 4.83 ###	43.50 ± 3.99 ### / *	27.33 ± 2.49 ###	27.16 ± 5.19 #
Spleen wet weight	0.056 ± 0.03	0.142 ± 0.01 ###	0.105 ± 0.01 *** / \$\$\$	0.154 ± 0.01	0.127 ± 0.01

<sup>§</sup>The effects of CTK 01512-2 (dosed i.v.) were compared to those displayed by ziconotide (i.v.) or fingolimod (p.o.).

## *p* < 0.01 and ### *p* < 0.001 significantly different from naive values.

\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 significantly different from vehicle values.

\$\$\$*p* < 0.001 significantly different from ziconotide values.

AUC = area under curve.

## CAPÍTULO III

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

No mundo, a EM afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas. Em números absolutos é uma prevalência global pequena. Todavia, terapias para EM têm sido um dos segmentos do mercado biofarmacêutico mais promissores, com mais de cinco novos medicamentos aprovados desde 2010; isto é, há um grande investimento na pesquisa básica e clínica para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença. Mercadologicamente falando, as terapias para EM cresceram a uma taxa de 12% ao ano, de 2011 a 2016.

Até o presente momento, existem três importantes áreas de inovação para o tratamento da EM: novos imunomoduladores, agentes moduladores do receptor de esfingosina 1-fosfato (S1PR) e neurorestauradores. Os novos imunomoduladores buscam uma eficácia e segurança superior aos fármacos de gerações anteriores, e o mecanismo de ação continua sendo a inibição de componentes autoimunes da EM, diminuindo os danos à bainha de mielina dos neurônios. Os moduladores de S1PR estão envolvidos na atenuação da proliferação celular, angiogênese e migração de células imunes. O fingolimode, agente utilizado neste estudo como controle positivo, foi o primeiro modulador S1PR aprovado para o tratamento da EM de por via oral, em 2010, nos EUA. Considerando o ano de 2016, o valor em vendas para esse fármaco foi de aproximadamente US\$ 3 bilhões em todo o mundo. Entretanto, o seu uso é limitado devido aos riscos cardíacos, causando bradicardia e desenvolvimento da síndrome do QT longo. Vários outros moduladores de S1PR estão sendo estudados para entrar no mercado, incluindo ozanimode, ponesimode e sinponimode. Todos ainda se encontram em estudos de fase III. Por último, a neurorestauração, que representa uma abordagem nova, vai além da modulação da inflamação, tendo o objetivo de restaurar a incapacidade neurológica. Um exemplo recente é o opicinumabe, um anticorpo monoclonal contra a proteína LINGO1, que tem como efeito promover a remielinização. Entretanto, resultados de ensaios clínicos de fase IIb mostraram ineficácia do fármaco candidato em desfechos primários como: melhora da incapacidade neurológica, sintomas neurofísicos e cognição. Metaforicamente observando, as cartas foram lançadas na mesa, e o jogador que as utilizar com maestria irá derrotar a banca (EM).

É improvável que uma doença tão complexa como a EM possa ser interrompida visando um único alvo farmacológico, de modo que, o tratamento da forma progressiva, provavelmente, exija uma combinação de terapias, somado aos cuidados não-medicamentosos. A evidência de que isso é viável vem de doenças cardiovasculares, isto é, onde há aplicação da “polifarmácia”, dietas nutricionais e exercício físico. O tratamento combinado personalizado talvez seja um

futuro próximo, e exigirá uma grande revisão das abordagens para o desenvolvimento de medicamentos e ensaios clínicos, incluindo novas maneiras de medir o risco-benefício por paciente. Ademais, deve-se buscar biomarcadores e desenvolver algoritmos que possam classificar os pacientes de acordo com seu risco de progressão da doença, permitindo que as decisões de tratamento sejam baseadas em alterações subclínicas e respostas ao tratamento.

Nos últimos 10 anos de pesquisa básica e clínica em EM, consolidou-se uma história de grande avanço terapêutico para neurologia. No entanto, ficaram extensas lacunas a serem preenchidas. O presente trabalho elucidou importantes questões de sinalização celular, trazendo novas evidências sobre a relevância do cálcio na EM, bem como, apresentando novas perspectivas de tratamento. Para a próxima década, um dos grandes desafios do tratamento da EM será entregar medicamentos específicos para forma progressiva da doença, ampliando o uso desses fármacos em distúrbios cerebrais crônicos associados às patologias neuroinflamatórias.



## CAPÍTULO IV

### PERSPECTIVAS

- i. Avaliar os efeitos de diferentes doses de CTK 01512-2 (0,6 e 1,8 mg/kg), por via endovenosa, assim como, a combinação de CTK 01512-2 + fingolimode (via oral), sobre os sinais e sintomas relacionados a EAE, após a injeção de MOG<sub>35-55</sub> em camundongos;
- ii. Analisar o efeito sistêmico de CTK 01512-2, sobre expressão dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo N, receptores de potencial transitório anquirina 1 na medula espinhal e encéfalo, através da técnica de Western Blot, 25 dias após a indução de EAE em camundongos;
- iii. Realizar a quantificação de cálcio intracelular em tipos celulares como: neurônio, oligodendrócito e astrócito sob o tratamento com CTK 01512-2, através da técnica de Patch-Clamp;
- iv. Avaliar os efeitos de CTK 01512-2 e CTK 01512-2 + fingolimode sobre linfócitos T, oligodendrócitos e axônios mielinizados, no cérebro e medula espinhal, através da técnica de imunofluorescência, no modelo de EAE por meio da aplicação de MOG<sub>35-55</sub> em camundongos;
- v. Avaliar a toxicidade crônica do tratamento sistêmico de CTK 01512-2 e CTK 01512-2 + fingolimode, sobre parâmetros hepáticos, cardíacos e metabólicos, no modelo animal de EM induzido pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub>;
- vi. Verificar a proliferação de linfócitos T do sistema nervoso central (*ex vivo*) e a produção citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ ) após a incubação de CTK 01512-2 e CTK 01512-2 + fingolimode.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson J, Bell C, Bishop J, Capila I, Ganguly T, Glajch J, *et al.* (2015). **Demonstration of equivalence of a generic glatiramer acetate (Glatopa).** *J Neurol Sci* 359(1-2): 24-34.
- Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, *et al.* (2003). **HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course.** *American journal of human genetics* 72(3): 710-716.
- Becher B, Spath S, Goverman J (2017). **Cytokine networks in neuroinflammation.** *Nat Rev Immunol* 17(1): 49-59.
- Borreani C, Bianchi E, Pietrolongo E, Rossi I, Cilia S, Giuntoli M, *et al.* (2014). **Unmet needs of people with severe multiple sclerosis and their carers: qualitative findings for a home-based intervention.** *PLoS One* 9(10): e109679.
- Bradding P, Wulff H (2009). **The K<sup>+</sup> channels K(Ca)3.1 and K(v)1.3 as novel targets for asthma therapy.** *Br J Pharmacol* 157(8): 1330-1339.
- Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, Koch-Henriksen N, Lucchinetti CF, Sorensen PS, *et al.* (2010). **Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis.** *Brain : a journal of neurology* 133(10): 2983-2998.
- Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH (2017). **Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges.** *Lancet* 389(10076): 1336-1346.
- Bucarety F, Deus Reinaldo CR, Hyslop S, Madureira PR, De Capitani EM, Vieira RJ (2000). **A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus Phoneutria.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42(1): 17-21.
- Bucarety F, Mello SM, Vieira RJ, Mamoni RL, Blotta MH, Antunes E, *et al.* (2008). **Systemic envenomation caused by the wandering spider Phoneutria nigriventer, with quantification of circulating venom.** *Clin Toxicol (Phila)* 46(9): 885-889.
- Calabrese M, Magliozzi R, Ciccarelli O, Geurts JJ, Reynolds R, Martin R (2015). **Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis.** *Nat Rev Neurosci* 16(3): 147-158.
- Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, *et al.* (2010a). **Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis.** *N Engl J Med* 362(5): 402-415.
- Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, *et al.* (2010b). **Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis.** *The New England journal of medicine* 362(5): 402-415.
- Cohen JA, Reingold SC, Polman CH, Wolinsky JS, International Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple S (2012). **Disability outcome measures in multiple sclerosis clinical trials: current status and future prospects.** *The Lancet. Neurology* 11(5): 467-476.

Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Muiola L, Bajenaru O, Carra A, *et al.* (2009). **Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** *Lancet* 374(9700): 1503-1511.

Compston A (1988). **The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 51(10): 1249-1252.

Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B (2011). **Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS).** *Br J Pharmacol* 164(4): 1079-1106.

Cortese M, Riise T, Bjornevik K, Holmoy T, Kampman MT, Magalhaes S, *et al.* (2015). **Timing of use of cod liver oil, a vitamin D source, and multiple sclerosis risk: The EnvIMS study.** *Mult Scler* 21(14): 1856-1864.

Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A (2011). **Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications.** *Biochimica et biophysica acta* 1812(2): 177-183.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, *et al.* (2003). **Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.** *Nature* 421(6924): 744-748.

da Gama Pereira AB, Sampaio Lacativa MC, da Costa Pereira FF, Papais Alvarenga RM (2015). **Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review.** *Mult Scler Relat Disord* 4(6): 572-579.

da Silva NL, Takemoto ML, Damasceno A, Frago YD, Finkelsztejn A, Becker J, *et al.* (2016). **Cost analysis of multiple sclerosis in Brazil: a cross-sectional multicenter study.** *BMC health services research* 16: 102.

Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015). **Immunopathology of multiple sclerosis.** *Nat Rev Immunol* 15(9): 545-558.

Diniz CR, Cordeiro Mdo N, Junor LR, Kelly P, Fischer S, Reimann F, *et al.* (1990). **The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer.** *FEBS Lett* 263(2): 251-253.

Dolati S, Babaloo Z, Jadidi-Niaragh F, Ayromlou H, Sadreddini S, Yousefi M (2017). **Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems.** *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 86: 343-353.

Dutra RC, Moreira EL, Alberti TB, Marcon R, Prediger RD, Calixto JB (2013). **Spatial reference memory deficits precede motor dysfunction in an experimental autoimmune encephalomyelitis model: the role of kallikrein-kinin system.** *Brain Behav Immun* 33: 90-101.

Fairless R, Williams SK, Diem R (2014). **Dysfunction of neuronal calcium signalling in neuroinflammation and neurodegeneration.** *Cell Tissue Res* 357(2): 455-462.

Farjam M, Zhang GX, Ciric B, Rostami A (2015). **Emerging immunopharmacological targets in multiple sclerosis.** *J Neurol Sci* 358(1-2): 22-30.

Farsky SH, Antunes E, Mello SB (2005). **Pro and antiinflammatory properties of toxins from animal venoms.** *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(3): 401-411.

Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, *et al.* (2009). **CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis.** *J Immunol* 183(11): 7602-7610.

Fontana MD, Vital-Brazil O (1985). **Mode of action of Phoneutria nigriventer spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat.** *Braz J Med Biol Res* 18(4): 557-565.

Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E (2017). **Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy.** *Cell journal* 19(1): 1-10.

Giovannoni G, Butzkueven H, Dhib-Jalbut S, Hobart J, Kobelt G, Pepper G, *et al.* (2016). **Brain health: time matters in multiple sclerosis.** *Mult Scler Relat Disord* 9 Suppl 1: S5-S48.

Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA (2002). **Phoneutria nigriventer venom: a cocktail of toxins that affect ion channels.** *Cell Mol Neurobiol* 22(5-6): 579-588.

Gomez RS, Casali TA, Romano-Silva MA, Cordeiro MN, Diniz CR, Moraes-Santos T, *et al.* (1995). **The effect of PhTx3 on the release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus.** *Neurosci Lett* 196(1-2): 131-133.

Goodin DS (2014). **Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis.** *Handb Clin Neurol* 122: 455-464.

Goodin DS (2016). **The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade.** *Handbook of clinical neurology* 138: 173-206.

Goodin DS, Cohen BA, O'Connor P, Kappos L, Stevens JC (2008). **Assessment: the use of natalizumab (Tysabri) for the treatment of multiple sclerosis (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology.** *Neurology* 71(10): 766-773.

Goverman J (2009). **Autoimmune T cell responses in the central nervous system.** *Nat Rev Immunol* 9(6): 393-407.

Grishin E (1999). **Polypeptide neurotoxins from spider venoms.** *Eur J Biochem* 264(2): 276-280.

Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2010). **An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis.** *PLoS One* 5(9).

Harrison AM, McCracken LM, Bogosian A, Moss-Morris R (2015). **Towards a better understanding of MS pain: a systematic review of potentially modifiable psychosocial factors.** *Journal of psychosomatic research* 78(1): 12-24.

Hedstrom AK, Alfredsson L, Olsson T (2016). **Environmental factors and their interactions with risk genotypes in MS susceptibility.** *Curr Opin Neurol* 29(3): 293-298.

Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L (2009). **Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis.** *Neurology* 73(9): 696-701.

Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L (2011). **Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis.** *Mult Scler* 17(7): 788-793.

Heinke B, Balzer E, Sandkuhler J (2004). **Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons.** *Eur J Neurosci* 19(1): 103-111.

Hemmer B, Muhlau M (2017). **Multiple sclerosis in 2016: Immune-directed therapies in MS - efficacy and limitations.** *Nat Rev Neurol* 13(2): 72-74.

Howard J, Trevick S, Younger DS (2016). **Epidemiology of Multiple Sclerosis.** *Neurologic clinics* 34(4): 919-939.

International Multiple Sclerosis Genetics C, Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, *et al.* (2013). **Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis.** *Nature genetics* 45(11): 1353-1360.

Isbister GK, Fan HW (2011). **Spider bite.** *Lancet* 378(9808): 2039-2047.

Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, *et al.* (2006). **The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells.** *Cell* 126(6): 1121-1133.

Jorg S, Grohme DA, Erzler M, Binsfeld M, Haghikia A, Muller DN, *et al.* (2016). **Environmental factors in autoimmune diseases and their role in multiple sclerosis.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(24): 4611-4622.

Joshi VR, Poojary VB (2014). **Jean Martin Charcot (1825-1893).** *The Journal of the Association of Physicians of India* 62(1): 77-78.

Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, *et al.* (2010). **A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis.** *N Engl J Med* 362(5): 387-401.

Karampampa K, Gustavsson A, Miltenburger C, Eckert B (2012). **Treatment experience, burden and unmet needs (TRIBUNE) in MS study: results from five European countries.** *Mult Scler* 18(2 Suppl): 7-15.

Korn T, Kallies A (2017). **T cell responses in the central nervous system.** *Nat Rev Immunol* 17(3): 179-194.

Kularatne SA, Senanayake N (2014). **Venomous snake bites, scorpions, and spiders.** *Handbook of clinical neurology* 120: 987-1001.

Kurtzke JF (1983). **Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS).** *Neurology* 33(11): 1444-1452.

Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Koebnick C (2013). **Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome.** *Neurology* 80(6): 548-552.

Leao RM, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirao PS (2000). **Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phosphatidylcholine nigriventris Tx3-3 peptide toxin.** *Neuropharmacology* 39(10): 1756-1767.

Lewis RJ, Garcia ML (2003). **Therapeutic potential of venom peptides.** *Nat Rev Drug Discov* 2(10): 790-802.

Lopez-Diego RS, Weiner HL (2008). **Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary.** *Nat Rev Drug Discov* 7(11): 909-925.

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, *et al.* (2014). **Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions.** *Neurology* 83(3): 278-286.

Lucas S (1988). **Spiders in Brazil.** *Toxicon* 26(9): 759-772.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007). **Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization.** *The Journal of clinical investigation* 117(1): 175-184.

Machado S (2012). **Recomendações Esclerose Múltipla.**

Marrie RA, Cutter G, Tyry T, Hadjimichael O, Campagnolo D, Vollmer T (2005). **Changes in the ascertainment of multiple sclerosis.** *Neurology* 65(7): 1066-1070.

Matarese G, Carrieri PB, Montella S, De Rosa V, La Cava A (2010). **Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis.** *Nat Rev Neurol* 6(8): 455-461.

Matas SL, Glehn F, Fernandes GB, Soares CA (2013). **Cerebrospinal fluid analysis in the context of CNS demyelinating diseases.** *Arq Neuropsiquiatr* 71(9B): 685-688.

Matthews EA, Bee LA, Stephens GJ, Dickenson AH (2007). **The Cav2.3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain.** *Eur J Neurosci* 25(12): 3561-3569.

Matthews EA, Dickenson AH (2001). **Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy.** *Pain* 92(1-2): 235-246.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, *et al.* (2001). **Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.** *Annals of neurology* 50(1): 121-127.

McGivern JG (2007). **Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain.** *Neuropsychiatr Dis Treat* 3(1): 69-85.

Montalban X, Tintore M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, *et al.* (2010). **MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes.** *Neurology* 74(5): 427-434.

Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, *et al.* (2015). **Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis.** *Nature genetics* 47(10): 1107-1113.

MSIF (2013a). **Atlas da Esclerose Múltipla: Mapeamento no mundo.**

Mullard A (2017). **FDA approvals for the first 6 months of 2017.** *Nat Rev Drug Discov* 16(8): 519.

Munger KL, Chitnis T, Ascherio A (2009). **Body size and risk of MS in two cohorts of US women.** *Neurology* 73(19): 1543-1550.

Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006). **Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis.** *Jama* 296(23): 2832-2838.

Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh, II, Sakurada Y, Murata A, *et al.* (2004). **Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel alpha 1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice.** *Brain Res* 1024(1-2): 122-129.

O'Connell K, Kelly SB, Fogarty E, Duggan M, Buckley L, Hutchinson M, *et al.* (2014). **Economic costs associated with an MS relapse.** *Mult Scler Relat Disord* 3(6): 678-683.

O'Connor AB, Schwid SR, Herrmann DN, Markman JD, Dworkin RH (2008). **Pain associated with multiple sclerosis: systematic review and proposed classification.** *Pain* 137(1): 96-111.

Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, *et al.* (2009). **Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome.** *Neurology* 72(9): 800-805.

Okuda DT, Siva A, Kantarci O, Inglese M, Katz I, Tutuncu M, *et al.* (2014). **Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event.** *PLoS One* 9(3): e90509.

Olitsky PK, Yager RH (1949). **Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice.** *The Journal of experimental medicine* 90(3): 213-224.

Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L (2017). **Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis.** *Nat Rev Neurol* 13(1): 25-36.

Palhares MR, Silva JF, Rezende MJS, Santos DC, Silva-Junior CA, Borges MH, *et al.* (2017). **Synergistic antinociceptive effect of a calcium channel blocker and a TRPV1 blocker in an acute pain model in mice.** *Life sciences* 182: 122-128.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, *et al.* (2011). **Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria.** *Annals of neurology* 69(2): 292-302.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, *et al.* (2005). **Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria"**. *Annals of neurology* 58(6): 840-846.

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, *et al.* (1983). **New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols**. *Annals of neurology* 13(3): 227-231.

Prado MA, Guatimosim C, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA (1996). **A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider Phoneutria nigriventer**. *Biochem J* 314 ( Pt 1): 145-150.

Procaccini C, Pucino V, Mantzoros CS, Matarese G (2015). **Leptin in autoimmune diseases**. *Metabolism: clinical and experimental* 64(1): 92-104.

Rangachari M, Kuchroo VK (2013). **Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology**. *J Autoimmun* 45: 31-39.

Ransohoff RM (2012). **Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line**. *Nature neuroscience* 15(8): 1074-1077.

Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF (2015). **Multiple sclerosis-a quiet revolution**. *Nat Rev Neurol* 11(3): 134-142.

Raposo C, Bjorklund U, Kalapothakis E, Biber B, Alice da Cruz-Hofling M, Hansson E (2016). **Neuropharmacological effects of Phoneutria nigriventer venom on astrocytes**. *Neurochem Int* 96: 13-23.

Reder AT, Oger JF, Kappos L, O'Connor P, Rametta M (2014). **Short-term and long-term safety and tolerability of interferon beta-1b in multiple sclerosis**. *Mult Scler Relat Disord* 3(3): 294-302.

Rigo FK, Trevisan G, Rosa F, Dalmolin GD, Otuki MF, Cueto AP, *et al.* (2013). **Spider peptide Phalpha1beta induces analgesic effect in a model of cancer pain**. *Cancer science* 104(9): 1226-1230.

Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD (2014). **The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment**. *Handbook of clinical neurology* 122: 173-189.

Rosa F, Trevisan G, Rigo FK, Tonello R, Andrade EL, Cordeiro Mdo N, *et al.* (2014). **Phalpha1beta, a peptide from the venom of the spider Phoneutria nigriventer shows antinociceptive effects after continuous infusion in a neuropathic pain model in rats**. *Anesth Analg* 119(1): 196-202.

Runia TF, Jafari N, Hintzen RQ (2013). **Application of the 2010 revised criteria for the diagnosis of multiple sclerosis to patients with clinically isolated syndromes**. *European journal of neurology* 20(12): 1510-1516.



Saab AS, Nave KA (2016). **Neuroscience: A mechanism for myelin injury.** *Nature* 529(7587): 474-475.

Salzer J, Hallmans G, Nystrom M, Stenlund H, Wadell G, Sundstrom P (2013). **Smoking as a risk factor for multiple sclerosis.** *Mult Scler* 19(8): 1022-1027.

Sandberg L, Bistrom M, Salzer J, Vagberg M, Svenningsson A, Sundstrom P (2016). **Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis.** *Mult Scler* 22(8): 1027-1031.

Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, *et al.* (1965). **Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 122: 552-568.

Shirani A, Okuda DT, Stuve O (2016). **Therapeutic Advances and Future Prospects in Progressive Forms of Multiple Sclerosis.** *Neurotherapeutics* 13(1): 58-69.

Simms BA, Zamponi GW (2014). **Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction.** *Neuron* 82(1): 24-45.

Sospedra M, Martin R (2005). **Immunology of multiple sclerosis.** *Annual review of immunology* 23: 683-747.

Sospedra M, Martin R (2016). **Immunology of Multiple Sclerosis.** *Seminars in neurology* 36(2): 115-127.

Stokes L, MacKenzie AB, Sluyter R (2016). **Editorial: Roles of Ion Channels in Immune Cells.** *Front Immunol* 7: 48.

Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM (2008). **Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells.** *Nat Med* 14(3): 337-342.

Stromnes IM, Goverman JM (2006). **Active induction of experimental allergic encephalomyelitis.** *Nature protocols* 1(4): 1810-1819.

Sundqvist E, Sundstrom P, Linden M, Hedstrom AK, Aloisi F, Hillert J, *et al.* (2012). **Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA.** *Genes and immunity* 13(1): 14-20.

Sundstrom P, Nystrom M, Ruuth K, Lundgren E (2009). **Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1\*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis.** *J Neuroimmunol* 215(1-2): 102-107.

t Hart BA, Jagessar SA, Kap YS, Haanstra KG, Philippens IH, Serguera C, *et al.* (2014). **Improvement of preclinical animal models for autoimmune-mediated disorders via reverse translation of failed therapies.** *Drug discovery today* 19(9): 1394-1401.

Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA (1987). **Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15): 5478-5482.

- Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ (2003). **Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis.** *Ann Neurol* 53(2): 189-197.
- Tonello R, Fusi C, Materazzi S, Marone IM, De Logu F, Benemei S, *et al.* (2017). **The peptide Phalpha1beta, from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice.** *Br J Pharmacol* 174(1): 57-69.
- Traka M, Podojil JR, McCarthy DP, Miller SD, Popko B (2016). **Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination.** *Nature neuroscience* 19(1): 65-74.
- Vasconcelos CC, Thuler LC, Rodrigues BC, Calmon AB, Alvarenga RM (2016). **Multiple sclerosis in Brazil: A systematic review.** *Clinical neurology and neurosurgery* 151: 24-30.
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, *et al.* (2008). **The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins.** *Nature* 453(7191): 106-109.
- Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P (2008a). **Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression.** *J Immunol* 180(9): 6411-6420.
- Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, *et al.* (2008b). **Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level.** *Immunology* 123(1): 79-89.
- Vidal-Jordana A, Montalban X (2017). Multiple Sclerosis: **Epidemiologic, Clinical, and Therapeutic Aspects.** *Neuroimaging clinics of North America* 27(2): 195-204.
- Wen L, Yang S, Zhou WX, Zhang YX, Zhou XW, Huang PT (2005). **Involvement of N-type calcium channels in pain and antinociception.** *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 36(1): 23-28.
- Winkelmann A, Loebermann M, Reisinger EC, Hartung HP, Zettl UK (2016). **Disease-modifying therapies and infectious risks in multiple sclerosis.** *Nat Rev Neurol* 12(4): 217-233.
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF (2000). **Decreased bioavailability of vitamin D in obesity.** *The American journal of clinical nutrition* 72(3): 690-693.
- Yaksh TL (2006). **Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain.** *J Pain* 7(1 Suppl 1): S13-30.
- Zamponi GW (2016). **Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases.** *Nat Rev Drug Discov* 15(1): 19-34.

## ANEXO A – Aprovação da CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 86/2014 - CEUA

Porto Alegre, 14 de novembro de 2014.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

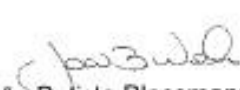
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 14/00424, intitulado "**Caracterização dos efeitos da isoforma Phc1 $\beta$  do veneno da aranha Phoneutria nigriventer no modelo de encefalomielite autoimune experimental**".

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
324	Mus musculus	11/2014 – 11/2018

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS


Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Martha Campos

FAMED

Nesta Universidade

## ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito

**MOLECULAR NEUROBIOLOGY**  Editorial Manager  
 Home • Logout • Help • Register • Update My Information • Journal Overview  
 Main Menu • Contact Us • Submit a Manuscript • Instructions for Authors  
 Role: Author Username: MCampus-654

**Submissions Being Processed for Author Maria Martha Campos**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">Send E-mail</a>	MOLN-D-17-01400	Beneficial effects of the calcium channel blocker CTK 01512-2 in a mouse model of multiple sclerosis	01 Dec 2017	01 Dec 2017	Submitted

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)