

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 08/06/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



EFEITO DA ESTABILIZAÇÃO DE MASTÓCITOS NO DESENVOLVIMENTO DA ENCEFALOMIELETTE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

Karen Henriette Pinke

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração *Biologia de parasitas e
microrganismos*.

Alexandrina Sartori

**BOTUCATU – SP
2017**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EFEITO DA ESTABILIZAÇÃO DE MASTÓCITOS NO
DESENVOLVIMENTO DA ENCEFALOMIELTE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

KAREN HENRIETTE PINKE

ALEXANDRINA SARTORI

VANESSA SOARES LARA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia de parasitas e microrganismos.

Alexandrina Sartori

**BOTUCATU – SP
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pinke, Karen Henriette.

Efeito da estabilização de mastócitos no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental / Karen Henriette Pinke. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Coorientador: Vanessa Soares Lara

Capes: 20100000

1. Esclerose múltipla. 2. Encefalomielite autoimune experimental. 3. Mastócitos. 4. Cetotifeno.

Palavras-chave: encefalomielite autoimune experimental; esclerose múltipla; fumarato de cetotifeno; mastócitos.

Karen Henriette Pinke

**Efeito da estabilização de mastócitos no desenvolvimento da
encefalomielite autoimune experimental**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Comissão examinadora

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Prof. Dr. José Maurício Sforcin
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Botucatu, 08 de junho de 2017

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho à energia que nos move diariamente em busca de uma evolução moral e espiritual. ”

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

a Deus e à vida em toda a sua plenitude por todos os momentos e circunstâncias vividas, os quais trouxeram-me a oportunidade de sentir, no meu interior, aquilo que é real e impulsionaram o desenvolvimento do meu caráter e a formação do meu Ser. Também agradeço por todas as vezes que sozinha, não me senti só e que, sem perceber, fui guiada.

a minha família e amigos. As palavras são dispensáveis para expressar a importância de vocês para mim. Não é preciso descrever aquilo que é real, pois a realidade é aquilo que experimentamos no nosso interior. Tudo o que vivemos juntos e aquilo que deixamos uns nos outros não precisa ser citado, apenas sentido.

a minha orientadora Alexandrina Sartori e coorientadora Vanessa Soares Lara. Agradeço, primeiramente, pela oportunidade e pelo empenho para que o meu doutorado se tornasse realidade. Agradeço também aos ensinamentos compartilhados e toda a dedicação com a minha formação profissional.

a equipe do laboratório de vacinas e imunomodulação por todos os momentos e ensinamentos compartilhados. Muito obrigada pelo empenho de todos durante a realização deste trabalho.

aos servidores, professores e colegas do departamento de Microbiologia e Imunologia, da seção de Pós-graduação e do Instituto de Biociências de Botucatu pelo acolhimento, boa convivência e todo o suporte técnico.

aos professores, servidores e amigos da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), em especial da disciplina de Patologia, por me acolherem com tanto carinho por todos estes anos.

a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiarem esta pesquisa através da concessão de bolsa de doutorado no âmbito do convênio FAPESP/CAPES (processo FAPESP nº 2014/00239-6). Este financiamento possibilitou que eu me dedicasse integralmente a este projeto e que eu expandisse meus horizontes através da participação em eventos científicos internacionais.

"Não sei se a vida é curta ou longa para nós. Mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido na vida. É o que faz com que ela seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

RESUMO

PINKE, K. H. **Efeito da estabilização de mastócitos no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental.** 2017. 89p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

A Esclerose múltipla é uma doença autoimune degenerativa que acomete jovens adultos, causando danos neuroaxonais e áreas de desmielinização no sistema nervoso central (SNC) devido a uma resposta autoimune mediada por linfócitos Th1, Th17 e T citotóxicos. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) constitui seu principal modelo de estudo e mastócitos parecem contribuir para os processos inflamatórios envolvidos na patogênese da EM/EAE. Seguindo este raciocínio, substâncias estabilizadoras de mastócitos, como o fumarato de cetotifeno, poderiam afetar o desenvolvimento destas doenças através do bloqueio dos processos de exocitose e desgranulação. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito desta droga no desenvolvimento da EAE. Para isto, camundongos C57BL/6 fêmeas submetidas à indução da EAE através da imunização com MOG/CFA e injeção de toxina *pertussis*, foram tratados com fumarato de cetotifeno (0,4 mg/kg via intraperitoneal) durante 11 dias, a partir do 7º dia após a indução. O efeito do tratamento no desenvolvimento clínico da EAE foi determinado pela avaliação de peso corporal e escore clínico. Posteriormente, parâmetros histopatológicos e imunológicos associados à doença, bem como a quebra da função da barreira hematoencefálica (BHE) foram avaliados. As comparações dos valores de incidência, escores clínicos diários e máximos, e de variação de peso corpóreo revelaram que o tratamento com cetotifeno reduziu a incidência e a gravidade da EAE. Este efeito protetor determinado pelo cetotifeno foi associado com a normalização da função da BHE e consequente ausência ou redução da infiltração de linfócitos no SNC, e ativação reduzida de micróglia. Também se verificou menor expressão gênica de quimase-1, mMCP-4 e carboxipeptidase-1 no SNC e grande ativação da resposta imune periférica em amostras de linfonodos e baço dos animais imunizados e tratados com cetotifeno. Considerando os resultados obtidos, concluiu-se que o tratamento com fumarato de cetotifeno impede o desenvolvimento clínico da EAE por mecanismos que envolvem a manutenção da função da BHE e consequente bloqueio da infiltração de linfócitos no SNC.

Palavras-chave: esclerose múltipla; encefalomielite autoimune experimental; fumarato de cetotifeno; mastócitos.

ABSTRACT

PINKE, K. H. **Effect of mast cell stabilization on experimental autoimmune encephalomyelitis development**, 2017. 89p. Thesis (PhD) – Institute of Biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

Multiple sclerosis is one of the most prevalent neurological human diseases. It triggers axonal damage and demyelinated areas in central nervous system (CNS) by an autoimmune response mediated by Th1, Th17 and T cytotoxic lymphocytes. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most employed model of study this disease and mast cells appear to contribute to MS- and EAE- underlying immunopathogenesis. In this scenario, mast cell stabilizer drugs, such as ketotifen fumarate, could affect the development of these diseases by the blockage of exocytosis and degranulation. The aim of this study was to evaluate the effect of this drug on the development of EAE. For this, MOG/CFA-immunized female C57BL/6 mice were treated with ketotifen fumarate. The effect of treatment was determined by body weight loss and clinical score. Subsequently, EAE-associated histopathological and immunological parameters, as well as breakdown of blood-brain and blood-spinal cord barrier were analyzed. Comparisons about incidence values, daily and maximum clinical scores, and body weight loss revealed that ketotifen-treatment reduced the EAE-incidence and -severity. This protection was associated with the restoration of blood-spinal cord barrier function, absence or reduction of SNC lymphocytic infiltration and reduced microglial activation. Lower chymase-1, mMCP-4 and carboxypeptidase-1 gene expressions were also detected in the CNS, as well as higher activation of peripheral immune response in lymph node and splenic samples from immunized mice treated with ketotifen. Considering these results, it was concluded that the treatment with ketotifen fumarate prevents the clinical development of EAE by mechanisms related to maintenance of blood-spinal cord barrier function and consequent blockage of CNS-inflammatory infiltrate.

Keywords: multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; ketotifen fumarate; mast cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Esclerose múltipla: aspectos gerais e imunopatogênese.....	11
1.2 Encefalomielite autoimune experimental.....	16
1.3 Mastócitos: aspectos gerais e participação na EM/EAE.....	19
1.4 Racional científico.....	23
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS & MÉTODOS	26
3.1 Animais e indução da EAE.....	27
3.2 Avaliação clínica da EAE.....	28
3.3 Coleta do soro, SNC e órgãos linfoides secundários.....	29
3.4 Análise histopatológica.....	29
3.5 Obtenção de células de baço, linfonodos e SNC.....	30
3.6 Produção de citocinas por células de baço e linfonodos.....	30
3.7 Quantificação de subpopulações de linfócitos T, células dendríticas, micróglia e mastócitos por citometria de fluxo.....	31
3.8 Níveis de expressão de transcritos relacionados às subpopulações de linfócitos T auxiliares, mastócitos eIDO em linfonodos e/ou medula espinhal por RT-PCR.....	33
3.9 Ensaio de barreira hematoencefálica.....	35
3.10 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Desenvolvimento clínico da EAE.....	38
4.2 Resposta imune periférica.....	41
4.3 Alterações no sistema nervoso central.....	53
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXO A - Aprovação do CEUA para o desenvolvimento da pesquisa.....	88
ANEXO B - Aprovação do CEEPA para o desenvolvimento da pesquisa.....	89

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose múltipla: aspectos gerais e imunopatogênese

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neurológica crônica caracterizada pela presença de áreas de desmielinização (placas) nas substâncias branca ou cinzenta provocadas por uma resposta autoimune contra componentes do sistema nervoso central (SNC). Os fatores que efetivamente desencadeiam esta resposta autoimune são desconhecidos, porém, está bem estabelecido que estes fenômenos geram inflamação desmielinizante no cérebro e medula espinhal, dano e perda axonal, afetando a função dos nervos envolvidos. Como consequência, os portadores da EM vivenciam quadros de disfunções neurológicas que podem afetar consideravelmente sua capacidade física, bem como sua vida socioeconômica, uma vez que, em grande parte dos casos, a doença atinge jovens adultos (20-30 anos de idade), especialmente mulheres, numa fase decisiva para o desenvolvimento pessoal e profissional. Dentre as primeiras manifestações clínicas da EM estão fraqueza de um ou mais membros, perda de visão, falta de coordenação motora e parestesia (BROWNE et al., 2014; DAMAL; STOKER; FOLEY, 2013; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; GRIGORIADIS; VAN PESCH; PARADIG, 2015; HOHLFELD, 2010).

As manifestações clínicas da EM e a dinâmica temporal do aparecimento dos sintomas são heterogêneos, porém existem classificações baseadas nestas características que tentam abranger os diversos quadros clínicos já observados. A EM recorrente-remittente (EM-RR) é a forma clínica que acomete a maior parte dos portadores (cerca de 85%) (DENDROU et al., 2015). Nesta condição, o portador apresenta quadros transitórios de disfunção neurológica (surtos), seguidos de períodos de recuperação dos sintomas (remissão). Em muitos casos, o acúmulo de lesões irreversíveis no SNC durante os surtos e a neurodegeneração agravam os sintomas. Como consequência, uma ou duas décadas depois do episódio inicial, cerca de 80 % dos portadores de EM-RR desenvolvem um segundo quadro clínico conhecido como fase secundária progressiva (EM-SP). Uma pequena parcela dos portadores de EM vivenciam o agravamento de sua condição clínica desde o episódio inicial da doença. Nestes casos, não são observados períodos de remissão. Esta condição é chamada de EM primária progressiva (EM-PP) (DENDROU et al., 2015; GRIGORIADIS et al., 2015).

A prevalência da EM na população mundial é outro dado preocupante. Segundo o atlas da esclerose múltipla de 2013 (BROWNE et al., 2014), o número estimado de portadores da EM passou de 2,1 milhões em 2008 para 2,3 milhões de pessoas afetadas mundialmente em 2013. Parte deste aumento foi atribuída à otimização dos métodos diagnósticos e coleta de

dados epidemiológicos. O aumento da expectativa de vida da população em geral e dos portadores da EM também são fatores que, possivelmente, contribuíram para este acréscimo (BROWNE et al., 2014). Regionalmente, América do Norte e parte da Europa são os locais com maior prevalência da EM; mais de 100 casos a cada 100.000 habitantes. No Brasil, estima-se 5,01-20 casos a cada 100.000 habitantes, variando de acordo com a região demográfica do país (COMINI-FROTA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2016).

Atualmente, não há cura para a EM. Os tratamentos disponíveis baseiam-se em drogas imunossupressoras e imunomoduladoras que interferem ou suprimem os mecanismos envolvidos na resposta autoimune, visando reduzir a frequência e a gravidade dos episódios da doença na sua forma recorrente-remitente. Entre os imunossupressores destacam-se: azatioprina, ciclofosfamida, mitoxantrona, metotrexato e ciclosporina. Para o tratamento dos surtos, utiliza-se a pulsoterapia (administração de altas doses de medicamentos por curtos períodos de tempo) com corticoides sintéticos, sendo a metilprednisolona o mais comumente utilizado. Dentre as drogas imunomoduladoras estão o interferon- β , acetato de glatiramer, fingolimod e anticorpos humanizados, como natalizumab que interfere na migração celular do sistema circulatório periférico para o SNC, e o alemtuzumab que induz linfopenia através de citotoxicidade dependente de anticorpos (COCLITU; CONSTANTINESCU; TANASESCU, 2016). A eficácia destas substâncias é variável e depende da resposta e adesão pelo paciente. Efeitos colaterais importantes tais como palpitações, ansiedade, dispneia, urticária, sintomas semelhantes aos da gripe e aparecimento de tumores ou problemas cardíacos, têm sido descritos (COCLITU et al., 2016; DAMAL et al., 2013; STUVE et al., 2008).

Até recentemente, não existia nenhuma droga aprovada com atuação específica no tratamento das condições progressivas da EM. Em geral, as terapias disponíveis não interferem, substancialmente, na progressão do dano e da perda neuroaxonal que levam à atrofia do cérebro observada nos portadores de EM-SP ou -PP. Essa resposta diferencial aos tratamentos reforça a hipótese de que diferentes mecanismos medeiam as respostas inflamatórias características dos surtos e dos danos neuroaxonais evidentes nas fases progressivas da EM (COCLITU et al., 2016; DENDROU et al., 2015). No entanto, em 28 de março de 2017, a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o ocrelizumab como a primeira droga imunomoduladora indicada para o tratamento da EM-PP <<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm549325.htm>>. O ocrelizumab é um anticorpo humanizado específico para a molécula CD20 que atua sobre os linfócitos B em diferentes estágios de maturação e poupa células negativas para este marcador, como plasmócitos produtores de anticorpos. Desse modo, os efeitos benéficos do ocrelizumab

parecem estar mais relacionados com a redução da produção de citocinas e da apresentação antigênica pelos linfócitos B do que com alterações na produção de anticorpos patogênicos. Três estudos clínicos de fase III estavam testando a ação desta droga e os resultados demonstraram redução na frequência anual de recidiva em portadores de EM-RR e redução da progressão clínica e das lesões avaliadas por ressonância magnética em portadores de EM-PP (HOHLFELD; MEINL, 2017).

A etiologia desta doença é complexa e pouco entendida. Predisposição genética e fatores ambientais são considerados importantes para o início e curso da EM (ASCHERIO, 2013; AXISA; HAFLER, 2016; ROTHHAMMER; QUINTANA, 2016). Agentes infecciosos e seus produtos estão entre estes fatores externos que podem influenciar o desenvolvimento desta doença (GILDEN, 2005; MARRIE, 2004). Por exemplo, grande porcentagem de pacientes com EM apresenta anticorpos para o vírus Epstein-Barr, em alguns estudos chegando a um percentual de 100 % (LOSSIUS et al., 2012). Outro fator ambiental associado com a incidência de EM é a exposição solar que, interessantemente, demonstra uma correlação inversa com a doença, ou seja, diminuição do risco de seu desenvolvimento com uma maior exposição do indivíduo à luz do sol (MILO; KAHANA, 2010). Esse efeito tem sido atribuído à ação da luz UVB na conversão da molécula 7-deidrocolesterol, presente nas camadas profundas da epiderme, em pré-vitamina D₃ e, posteriormente, em vitamina D₃. A vitamina D (VitD₃) tem sido implicada como um agente protetor frente às doenças infecciosas como a tuberculose, mas também nas doenças alérgicas e nas autoimunes como a EM (PLUDOWSKI et al., 2013; YANG et al., 2013).

O local onde a resposta autoimune é desencadeada representa outra importante questão a ser desvendada na etiologia da EM. Uma das hipóteses mais aceitas postula a ocorrência de ativação periférica de linfócitos T autorreativos, possivelmente ocasionada por reações cruzadas de células específicas para peptídeos virais ou microbianos (mimetismo molecular), junto com uma quebra da tolerância periférica. Estes linfócitos migrariam para o interior do SNC, junto de outras células como linfócitos B e monócitos, estabelecendo a neuroinflamação. Esta dinâmica é observada na encefalomielite autoimune experimental (EAE), modelo amplamente utilizado para o estudo dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na EM. Diferentemente, outra hipótese considera que eventos intrínsecos ao SNC, como infecções virais e traumas, liberariam antígenos sequestrados, desencadeando a neuroinflamação, possivelmente através da apresentação destes antígenos a linfócitos circulantes no espaço subaracnoidal ou devido ao escape destes peptídeos através dos fluidos drenados do SNC. Nestes casos, a migração de linfócitos T autorreativos aconteceria de forma secundária. É

possível notar que, em ambas as hipóteses, fatores ambientais teriam papel crucial na ativação da resposta autoimune em conjunto com fatores genéticos ligados à quebra da tolerância periférica (DENDROU et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017).

Evidências recentes sugerem também que a microbiota intestinal pode contribuir com as doenças neurológicas, incluindo a EM (TREMLET et al., 2017). Segundo este conceito que está se delineando, um perfil pró-inflamatório intestinal associado com o acúmulo de linfócitos T autorreativos no tecido linfático do intestino desencadearia, juntamente com fatores genéticos predisponentes, estas patologias inflamatórias envolvendo o SNC (WEKERLE, 2016). Estudos mostrando disbiose em pacientes com EM e associação entre composição da microbiota e desenvolvimento de EAE dão suporte a esta possível correlação (GLENN; MOWRY, 2016).

Embora os fenômenos envolvidos na imunopatogênese da EM não estejam completamente elucidados, a importância da neuroinflamação nesses processos está consolidada. Independente de uma ativação da resposta autoimune intrínseca ou extrínseca ao SNC, as células inflamatórias adentram os tecidos nervosos através da barreira hematoencefálica (BHE) ou do fluido cefalorraquidiano no plexo coroide e estabelecem o infiltrado inflamatório no parênquima do órgão e nas regiões de leptomeninges (DENDROU et al., 2015). Esta infiltração de células inflamatórias nos tecidos do SNC é detectada em todos os estágios e formas clínicas da EM, de modo mais pronunciado na fase aguda ou lesões ativas e na EM-RR (FRISCHER et al., 2009). Em especial, nas meninges de pacientes com EM-SP são encontradas estruturas linfoides terciárias formadas por agregados de plasmócitos, linfócitos B, T e células dendríticas foliculares. Já nas meninges de pacientes com a forma primária progressiva da EM observa-se infiltrado difuso sem a presença destas estruturas especializadas (DENDROU et al., 2015; GRIGORIADIS et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017).

Diversos tipos celulares estão envolvidos na imunopatogênese da EM e isto fica evidente quando terapias que afetam leucócitos em geral melhoram a progressão da doença (COLES et al., 2006; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2016; LASSMANN; BRADL, 2017). Análises de lesões de EM sugerem que linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) e B possuem proeminentes papéis na neuroinflamação devido à abundância de linfócitos T $CD8^+$ em relação à linfócitos T $CD4^+$ ou T auxiliares em lesões ativas (BABBE et al., 2000; FRISCHER et al., 2009), bem como de plasmócitos secretando anticorpos em lesões de pacientes com EM-SP ou -PP (FRISCHER et al., 2009). O sucesso do tratamento de pacientes com diferentes formas clínicas da EM com ocrelizumab também reforça a importante participação de linfócitos B na imunopatogênese da doença que, neste caso, parece estar mais relacionada com a capacidade dessas células em apresentar antígenos (HOHLFELD; MEINL, 2017). Isto não descarta a

participação de linfócitos T CD4⁺ na imunopatogênese da doença humana, a qual parece estar mais envolvida com os processos inflamatórios iniciais (DENDROU et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017). Dentre os linfócitos T CD4⁺, estudos principalmente desenvolvidos com a EAE destacam a importância de linfócitos Th1 e Th17, subtipos de linfócitos T auxiliares caracterizados pela produção das citocinas IFN- γ e IL-17, respectivamente (DENDROU et al., 2015; FLETCHER et al., 2010; LEGROUX; ARBOUR, 2015). No entanto, a importância relativa de cada um destes subtipos de linfócitos e das citocinas relacionadas é controversa no contexto da EM. Embora a mudança de perfil destas subpopulações de linfócitos para um fenótipo Th2 seja considerada como o mecanismo protetor induzido pelo tratamento com IFN- β (KOZOVSKA et al., 1999), a falha no tratamento com ustekinumab, um anticorpo contra a subunidade p40 presente nas citocinas IL-12 e IL-23, importantes no desenvolvimento das respostas Th1 e Th17, respectivamente, pode estar relacionada com uma reduzida participação destas citocinas e subtipos de linfócitos em estágios mais tardios da EM (MARTIN, 2008; SEGAL et al., 2008). Contudo, as citocinas IFN- γ e IL-17, juntamente com TNF- α e IL-6, parecem ter papel importante no processo inflamatório e subsequente degeneração axonal, morte dos oligodendrócitos e disfunção neuronal (DENDROU et al., 2015; FURUZAWA-CARBALLEDA; VARGAS-ROJAS; CABRAL, 2007; SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Além disso, são encontradas células CD4⁺ expressando, concomitantemente, IFN- γ e IL-17, bem como linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-17, principalmente em lesões ativas, nas quais muitos linfócitos T CD4⁺ também são positivos para IL-17 (TZARTOS et al., 2008).

No parênquima do órgão ocorre a ativação de micróglia e astrócitos, células residentes do SNC, as quais, juntamente com os macrófagos, permanecem ativados na fase crônica da doença (DENDROU et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017). Micróglia e macrófagos encontrados no SNC são células imunes que compartilham aspectos morfológicos e marcadores moleculares, porém com origens distintas. Em humanos, progenitores mielóides povoam o SNC durante o desenvolvimento fetal e dão origem às micróglia, encontradas somente nos tecidos nervosos. Já os macrófagos encontrados no SNC são originados de monócitos circulantes que infiltram os tecidos nervosos após dano tecidual. Como estas células compartilham a expressão de alguns marcadores, a identificação destes tipos celulares nos tecidos nervosos baseia-se, rotineiramente, no nível de expressão de CD45. Células do sistema imunológico infiltrantes no tecido-alvo expressam altos níveis de CD45, enquanto que micróglia são CD45^{low}.

Recentemente, foi descoberto o marcador Tmem119, expresso somente em micróglias de humanos e camundongos (BENNETT, M. L. et al., 2016; DAVIES; MIRON, 2016).

A imunopatogênese da EM também tem sido atribuída a defeitos na atividade funcional de linfócitos T reguladores (Tregs). Essas células são importantes não apenas para a manutenção da tolerância periférica, mas também para controlar a autoimunidade órgão-específica através da supressão de células T autorreativas (TANG et al., 2004). Alguns trabalhos têm demonstrado redução da frequência e da atividade supressora dessas células e de subtipos específicos, como CD39⁺, em pacientes com EM (PROCACCINI et al., 2015). Estes defeitos podem estar associados à reduzida frequência de Tregs *naïve* circulantes (CD45RA⁺CD31⁺), expansão insuficiente de Tregs de memória ou mudança fenotípica de Tregs para células Th1-like secretoras de IFN- γ . Além disso, pode haver uma resistência das células efetoras aos mecanismos de supressão (DENDROU et al., 2015; FLETCHER et al., 2010; HAAS et al., 2005; HUAN et al., 2005; VENKEN et al., 2008).

Associados aos fenômenos inflamatórios, observam-se redução da mielina e dano axonal com conseqüente atrofia das substâncias branca e cinzenta (GRIGORIADIS et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017). Outras características histopatológicas clássicas da EM incluem a morte de oligodendrócitos e presença de gliose, que se caracteriza por aumento do número de células da glia na substância branca (EDWARDS et al., 2011).

1.2 Encefalomielite autoimune experimental

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é uma doença inflamatória desmielinizante induzida em diferentes vertebrados através da sensibilização com antígenos provenientes do SNC emulsificados em adjuvante completo de Freund (CFA). Em camundongos, para que a doença se desenvolva é, geralmente, necessária a inoculação de toxina *pertussis*. Dentre os possíveis efeitos desta toxina estão a inibição da anergia periférica, supressão da atividade das Tregs, indução de IL-6 e IL-1 β e aumento da permeabilidade da BHE (BILLIAU; MATTHYS, 2001; DUMAS et al., 2014; LASSMANN; BRADL, 2017; LINTHICUM; MUNOZ; BLASKETT, 1982; RONCHI et al., 2016; ROY et al., 2012). A EAE também pode ser induzida passivamente através da transferência adotiva de linfócitos específicos para antígenos do SNC de um animal doador para um receptor. No entanto, mesmo nestes casos, a sensibilização ativa é etapa fundamental, uma vez que é por meio dela que os linfócitos encefalitogênicos que serão transferidos de um animal doador para um receptor serão estimulados a proliferar (KAWAKAMI et al., 2012; LASSMANN; BRADL, 2017).

Devido às semelhanças com a patogênese da EM, a EAE tem sido considerada um modelo experimental da doença humana. No entanto, nenhum protocolo de indução da EAE consegue reproduzir integralmente os fenômenos observados na EM e as características clínicas e moleculares do modelo variam de acordo com o protocolo de sensibilização e com as características genéticas do animal utilizado (PROCACCINI et al., 2015). Embora seja uma desvantagem não reproduzir integralmente os fenômenos observados na EM, a diversidade de quadros clínicos que podem ser gerados através da indução da EAE é um aspecto interessante, uma vez que permite a escolha do modelo mais adequado para os objetivos do estudo, além de constituir uma fonte mais acessível de tecido nervoso afetado, um desafio no estudo da EM, o qual é principalmente baseado em biópsias e imagens de ressonância magnética (FLETCHER et al., 2010; LASSMANN; BRADL, 2017; PROCACCINI et al., 2015). Protocolos de sensibilização ativa envolvendo camundongos, ratos, cobaias ou primatas geram inflamação e placas de desmielinização, as quais podem ser primárias semelhantes às observadas nas lesões da EM, ou secundárias devido à degeneração axonal (LASSMANN; BRADL, 2017). Dentre estes, a imunização de camundongos com peptídeo da glicoproteína de mielina de oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) emulsificados em CFA, associada à inoculação de toxina *pertussis*, constitui um dos modelos mais utilizados, principalmente para estudos dos mecanismos moleculares, da participação de diferentes células imunes e também para testes de terapias imunomoduladoras ou imunossupressoras (LASSMANN; BRADL, 2017; PROCACCINI et al., 2015). Este protocolo de indução da EAE gera uma doença inflamatória aguda ou crônica na medula espinhal mediada principalmente por linfócitos T auxiliares com a participação de linfócitos T citotóxicos. Clinicamente é caracterizada por alterações motoras que podem levar à paraplegia dos animais. Histopatologicamente, observa-se presença de infiltrado inflamatório mononuclear e degeneração axonal com desmielinização, principalmente secundária, alterações que são mais evidentes na medula espinhal do que nos tecidos cerebrais (LASSMANN; BRADL, 2017). Outros modelos envolvendo indução passiva, toxinas, infecções virais e animais transgênicos que expressam moléculas humanas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou que, sob determinadas condições, desenvolvem espontaneamente a EAE devido a presença de receptores nos linfócitos T que reconhecem antígenos cerebrais, também são desenvolvidos de acordo com os objetivos do estudo (FLETCHER et al., 2010; LASSMANN; BRADL, 2017).

Como citado, a resposta inflamatória induzida na EAE é principalmente mediada por linfócitos T auxiliares específicos para o antígeno utilizado na sensibilização (CHENG et al., 2017; FLETCHER et al., 2010). Este aspecto está possivelmente relacionado com as diferenças

clínicas e histopatológicas observadas em relação à EM, na qual linfócitos T citotóxicos e B, além de macrófagos, parecem desenvolver papéis mais contundentes na imunopatogênese da doença humana (LASSMANN; BRADL, 2017). Em relação à EAE, estudos acerca da participação de linfócitos T citotóxicos e B são menos numerosos que aqueles direcionados aos linfócitos T auxiliares e modelos de indução da EAE direcionados para o estudo destas células são escassos (LASSMANN; BRADL, 2017).

Estudos envolvendo transferência adotiva de clones Th1 específicos destacam a importância destas células e das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α no desenvolvimento de uma EAE grave (FLETCHER et al., 2010; KLINKERT et al., 1997; LOVETT-RACKE; YANG; RACKE, 2011; SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Além disso, camundongos *knockout* de T-bet, fator de transcrição relacionado com a diferenciação de linfócitos Th1, imunizados com MOG foram resistentes ao desenvolvimento da EAE (BETTELLI et al., 2004). Neste contexto, células Th17 também parecem desempenhar um papel crítico na patogênese da EAE, principalmente nos eventos patológicos iniciais (ARANAMI; YAMAMURA, 2008; ROSTAMI; CIRIC, 2013; WOJKOWSKA et al., 2014). Por exemplo, animais deficientes em IL-17 desenvolvem EAE mais tardiamente e com sintomatologia mais branda (KOMIYAMA et al., 2006). Tem sido constatada a participação destas células na ruptura da BHE e na dinâmica de infiltração de células T, a qual ocorre quando existe predominância de células Th17 em relação às Th1 (HUPPERT et al., 2010; MURPHY et al., 2010; WOJKOWSKA et al., 2014). O fato de células Th17 específicas para mielina também determinarem o desenvolvimento de EAE por transferência adotiva de células comprovam também sua participação na EAE (FLETCHER et al., 2010; KOMIYAMA et al., 2006; MURPHY et al., 2010; ROSTAMI; CIRIC, 2013).

Após a ativação periférica dos linfócitos Th autorreativos, estas células migram através do sistema circulatório para regiões intimamente ligadas ao SNC, como as meninges, antes de adentrarem o parênquima do tecido. Tem sido proposto um modelo de 2 etapas para explicar a entrada de linfócitos autorreativos no SNC. Inicialmente, estas células adentrariam o plexo coroide, região altamente vascularizada localizada nos ventrículos e responsável pela produção do líquido cefalorraquidiano. Nesta região alguns linfócitos autorreativos adentrariam o parênquima do plexo coroide através de capilares fenestrados e, subsequentemente atingiriam o líquido cefalorraquidiano e o espaço subaracnoidal através das células epiteliais (LOPES PINHEIRO et al., 2016). Neste percurso os linfócitos seriam reestimulados por células imunes residentes como células dendríticas (DCs) e mastócitos (LOPES PINHEIRO et al., 2016; WALKER-CAULFIELD; HATFIELD; BROWN, 2015). Posteriormente ocorreria então a

segunda etapa na qual a inflamação nas meninges causada pela liberação de mediadores na região pelas células infiltrantes e residentes facilitaria a entrada massiva de células pela BHE (RUSSI; BROWN, 2015; WALKER-CAULFIELD et al., 2015). A BHE é a estrutura especializada que forma grande parte da interface entre o sistema circulatório e o SNC garantindo a homeostase dos tecidos e órgãos deste sistema através de uma alta seletividade em relação ao transporte de substâncias e células para o SNC. Esta estrutura é composta por células endoteliais especializadas, pericitos e astrócitos que interagem entre si e com outras células residentes do SNC como neurônios e células da imunidade, como os mastócitos, através de diversas moléculas e sistemas enzimáticos para garantir o controle deste transporte (BANKS, 2016; VARATHARAJ; GALEA, 2017). A inflamação é um processo capaz de afetar a função normal da BHE, promovendo um aumento da permeabilidade desta estrutura. Como citado, esta quebra da função da BHE é um importante evento na imunopatogênese da EM e da EAE (LOPES PINHEIRO et al., 2016; SCHENK; DE VRIES, 2016). A atração de neutrófilos através da produção de TNF- α por mastócitos e a liberação de mediadores, enzimas e espécies reativas do oxigênio por estas células é um exemplo de mecanismo de quebra da BHE que foi observado na imunopatogênese da EAE (CHRISTY et al., 2013; RODRIGUES; GRANGER, 2015).

No parênquima do SNC, os linfócitos autorreativos e macrófagos infiltrantes interagem com células residentes, como as micróglias, oligodendrócitos e neurônios, estimulando a neuroinflamação e causando desmielinização primária ou secundária e dano neuroaxonal (CHENG et al., 2017; FLETCHER et al., 2010; WALKER-CAULFIELD et al., 2015).

1.3 Mastócitos: aspectos gerais e participação na EM/EAE

Inicialmente, acreditava-se que os mastócitos eram importantes somente nas reações alérgicas e como gatilho dos fenômenos vasculares da inflamação. Entretanto, a participação destas células nas infecções e doenças autoimunes vem sendo ressaltada (BROWN; HATFIELD, 2012; TAYLOR; METCALFE, 2001). Os mastócitos estão amplamente distribuídos no organismo, inclusive no SNC, principalmente próximo das meninges e da BHE (NELISSEN et al., 2013; SILVER; CURLEY, 2013). Estas células possuem grande plasticidade fenotípica, adequando-se ao ambiente e, desta forma, sendo distinguidas em subpopulações devido à sua localização ou ao conteúdo de seus grânulos intracitoplasmáticos (MOON et al., 2010; SILVER; CURLEY, 2013).

No contexto da presente pesquisa, inúmeras evidências relacionadas à ação dos mastócitos sobre componentes do SNC e regulação da resposta imune embasam os estudos

sobre sua participação na patogênese da EM/EAE (CONTI; KEMPURAJ, 2016). Tem sido descrito que diversos mediadores estocados nos grânulos ou sintetizados *de novo* pelos mastócitos possuem atividade sobre o SNC (NELISSEN et al., 2013; SILVER; CURLEY, 2013). Histamina, TNF- α , IL-6 e fator de crescimento neural são exemplos destes mediadores que causam, entre outros efeitos, modulação da permeabilidade da BHE, recrutamento de neutrófilos, regulação da atividade microglial e promoção de sobrevivência e diferenciação de neurônios (COSTANZA; COLOMBO; PEDOTTI, 2012; NELISSEN et al., 2013; SILVER; CURLEY, 2013). Esses mediadores podem atuar nas células do SNC através de sua liberação por desgranulação ou pelo fenômeno denominado transgranulação (transferência dos grânulos por emissão de pseudópodos que se ligam na membrana da célula adjacente). A transgranulação tem sido descrita como responsável pela presença de mediadores de mastócitos no citoplasma de neurônios (NELISSEN et al., 2013; WILHELM; SILVER; SILVERMAN, 2005). Especificamente com relação à histamina, estudo recente demonstrou a ação regulatória deste mediador sobre as respostas de células T, a produção de citocinas por células apresentadoras de antígenos, a permeabilidade da BHE e a atividade de Tregs (SALIGRAMA et al., 2013). Evidências também sugerem uma participação direta dos mastócitos na degradação da mielina (AMOR; WOODROOFE, 2014; KARAGKOUNI; ALEVIZOS; THEOHARIDES, 2013).

Com relação à modulação local da resposta imune, mastócitos produzem IL-23, TGF- β e IL-6, importantes para o desenvolvimento das respostas Th17 (CHEN, G.; SHANNON, 2013), além da IL-12, essencial para a diferenciação de linfócitos Th1 (GREGORY et al., 2005; SAYED; BROWN, 2007) e IL-4, importante na imunidade humoral (HERSHKO; RIVERA, 2010). Considerados por alguns autores como células apresentadoras de antígenos (APC), mastócitos também poderiam reativar localmente linfócitos que migraram para regiões importantes na patogênese da EAE, como meninges e parênquima do SNC, através da interação celular direta (BROWN; HATFIELD, 2012; MOON et al., 2010; SILVER; CURLEY, 2013). Dentre as moléculas participantes destas interações e expressas em mastócitos estão ICAM-1 (CD54), ICOS-L, PD-L1, PD-L2, OX40L, CD153, Fas, CD40L, CD80, CD86, MHC de classe I e II (HERSHKO; RIVERA, 2010). Considerando este potencial inflamatório dos mastócitos, estudos focando a participação destas células na EM/EAE vêm sendo desenvolvidos.

Grande parte das evidências científicas apontam para uma participação ativa na patogênese destas doenças, enquanto que poucos estudos reportam ausência de participação dos mastócitos ou atuação protetora/reguladora dos processos inflamatórios e de lesão no SNC (BENNETT, J. L. et al., 2009; CONTI; KEMPURAJ, 2016; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2016; NELISSEN et al., 2013). A presença de mastócitos nas lesões de pacientes com EM já vem

sendo descrita, bem como seu aumento próximo aos sítios de inflamação desmielinizante em pacientes com EM e em roedores com EAE. Foram também observados níveis elevados de triptase e histamina no fluido cérebro-espinhal de pacientes com EM (BROWN; HATFIELD, 2012; WALKER; HATFIELD; BROWN, 2012). Nas lesões de EAE em roedores, foram detectados aumento da desgranulação de mastócitos e elevados níveis de suas proteases (SILVER; CURLEY, 2013). De fato, a interação entre mastócitos e linfócitos na EAE parece causar a proliferação local de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suprimir Tregs, o que contribuiria para o desenvolvimento da EAE e possivelmente da EM (HERSHKO; RIVERA, 2010; HONG et al., 2015). Em contrapartida, tratamentos que culminaram no recrutamento de Tregs para o SNC determinaram redução da gravidade da EAE, o que foi associado com inativação de rotas secretoras de mastócitos via eixo OX40/OX40L e supressão da migração destas células para o SNC através da diminuição da expressão de CCL2/CCR2, V-CAM-1 e PECAM-1 (HONG et al., 2013). Experimentos envolvendo camundongos *knockout* para mastócitos demonstraram, em sua maioria, uma diminuição da gravidade da doença, a qual pode ser restabelecida pelo repovoamento seletivo com mastócitos gerados a partir de células-tronco medulares (SILVER; CURLEY, 2013).

Evidências recentes sugerem uma participação relevante dos mediadores produzidos por estas células nos fenômenos iniciais da patogênese da EAE. A liberação de TNF- α por mastócitos presentes nas meninges parece ser fundamental para o recrutamento de neutrófilos, os quais induzem a permeabilização da BHE (CHRISTY et al., 2013; WALKER-CAULFIELD et al., 2015). Outras evidências indicam que a IL-1 β produzida de maneira dependente de caspase-1 por mastócitos residentes nas meninges de animais com EAE induz a expressão de GM-CSF em linfócitos T autorreativos, condição que foi associada com a capacidade dos linfócitos adentrarem o SNC. Neste mesmo estudo, os autores destacam que a co-localização de mastócitos e linfócitos T foi observada em lesões de portadores de EM em fase aguda. Este aspecto sugere uma possível interação entre estas células na doença humana (RUSSI; WALKER-CAULFIELD; GUO; et al., 2016).

Substâncias inibidoras de atividade dos mastócitos também têm mostrado ação sobre sinais clínicos da EAE ou eventos neuroinflamatórios, e podem representar estratégias terapêuticas em processos inflamatórios com atuação evidente destas células (COSTANZA et al., 2012; DIMITRIADOU; PANG; THEOHARIDES, 2000). A administração de proxicrimil 3 dias após a indução da EAE por transferência adotiva preveniu o aparecimento dos sinais clínicos (DIETSCH; HINRICHS, 1989). Em outro estudo, o tratamento oral com hidroxizina reduziu a gravidade da EAE (DIMITRIADOU et al., 2000). A injeção de cromoglicato de sódio

no hipotálamo foi capaz de inibir a ativação da micróglia induzida pela inoculação do composto 48/80, um secretagogo com ação sobre mastócitos, e reduziu a produção de citocinas (DONG et al., 2017). Outro exemplo deriva de um modelo de isquemia cerebral focal, no qual a administração intraventricular de cromoglicato de sódio reduziu a quebra da BHE, o edema cerebral e a infiltração de neutrófilos no SNC (MCKITTRICK; LAWRENCE; CARSWELL, 2015).

Entre as drogas que possuem atividade sobre mastócitos, o fumarato de cetotifeno (cetotifeno), comumente empregado no tratamento de doenças alérgicas humanas, é uma droga anti-histamínica de segunda geração e um forte estabilizador de mastócitos (BABA et al., 2016; FINN; WALSH, 2013; KABRA et al., 2000; WADE; BIELORY; RUDNER, 2012). Através da prevenção da deformação da membrana plasmática e do influxo de cálcio, o cetotifeno inibe a degranulação de mastócitos, bem como a exocitose de mediadores produzidos *de novo*. Além disso, esta droga exibe ação antifosfatidíesterase, impedindo a síntese de prostaglandinas e leucotrienos (BABA et al., 2016; CRAPS; NEY, 1984; MONUMENT et al., 2015; WADE et al., 2012). Efeitos sobre outros fenômenos e tipos celulares não podem ser descartados. A ação do cetotifeno sobre diferentes mecanismos inflamatórios e tipos celulares foi pouco estudada. Em alguns relatos, não é possível afirmar se alterações causadas por esta droga decorreram de um efeito direto nos mecanismos estudados ou indireto através da modulação de mastócitos. Hui e Yu em 1986, demonstraram que o cetotifeno induz aumento dos níveis de AMP cíclico em linfócitos e relacionaram este fenômeno com o efeito profilático observado na asma. Por outro lado, doses de até 10 μ M de cetotifeno não afetaram a proliferação e migração de linfócitos T e a produção de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α e IFN- γ por estas células (HUI; YU, 1987). Em macrófagos também não foram observadas alterações dependentes do cetotifeno na produção de IL-6 e TNF- α (NORI et al., 2003). Snyman e colaboradores (1992) observaram diminuição de infiltrado de basófilos, eosinófilos e linfócitos na pele de pacientes atópicos tratados com cetotifeno (SNYMAN et al., 1992). Efeito protetor do cetotifeno também foi observado em um modelo de enterocolite (POTHOULAKIS et al., 1993). Redução da inflamação do epitélio e necrose foram associados com diminuição da secreção de mediadores por mastócitos e neutrófilos: leucotrienos, fator ativador de plaqueta e protease 4 de mastócitos (POTHOULAKIS et al., 1993). Em células tumorais, o cetotifeno afetou a migração e a invasão *in vitro*, e suprimiu a expressão de moléculas envolvidas com estes fenômenos (CDC42, Rac e Rho) (KIM, H. J. et al., 2014). *In vivo*, observou-se que o tratamento com cetotifeno de ratos com câncer de mama logo após a indução da neoplasia reduziu os índices de proliferação tumoral e de apoptose (FAUSTINO-ROCHA et al., 2017). Drogas estabilizadoras de

mastócitos, como o próprio cetotifeno, têm sido consideradas para o tratamento de doenças metabólicas como a obesidade e diabetes (WANG et al., 2011).

1.4 Racional científico

Nos últimos anos, a EM tem sido a segunda doença autoimune mais abordada em artigos publicados em inglês no PUBMED (SELMÍ, 2013) e sua prevalência na população mundial é uma das maiores entre as doenças que acometem o SNC (BROWNE et al., 2014). Grande parte de nosso conhecimento sobre a EM deriva de estudos feitos com a EAE. A patogênese de ambas envolve um processo inflamatório de origem autoimune, no qual os mastócitos, células altamente relacionadas com fenômenos inflamatórios e vasculares, e consideradas um elo entre as respostas imunes inata e adaptativa, podem estar envolvidos. Considerando que a inibição da exocitose e a consequente redução de mediadores produzidos pelos mastócitos poderia afetar os fenômenos imunológicos e vasculares envolvidos neste processo, drogas estabilizadoras de mastócitos como o cetotifeno poderiam controlar em parte o processo inflamatório associado à EAE/EM e, portanto, serem explorados como terapia adjunta nestas patologias.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O tratamento com fumarato de cetotifeno impede o desenvolvimento clínico da encefalomielite autoimune experimental por mecanismos que envolvem a manutenção da função da barreira hematoencefálica e consequente bloqueio da infiltração inflamatória no sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS

- AMOR, S.; WOODROOFE, M. N. Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. **Immunology**, v. 141, n. 3, p. 287-91, Mar 2014.
- ANGIARI, S. Selectin-mediated leukocyte trafficking during the development of autoimmune disease. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 11, p. 984-95, Nov 2015.
- ARANAMI, T.; YAMAMURA, T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). **Allergol Int**, v. 57, n. 2, p. 115-20, Jun 2008.
- ARGAW, A. T. et al. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. **J Immunol**, v. 177, n. 8, p. 5574-84, Oct 15 2006.
- ASCHERIO, A. Environmental factors in multiple sclerosis. **Expert Rev Neurother**, v. 13, n. 12 Suppl, p. 3-9, Dec 2013.
- AXISA, P. P.; HAFLER, D. A. Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. **Curr Opin Neurol**, v. 29, n. 3, p. 345-53, Jun 2016.
- BABA, A. et al. Anti-Allergic Drugs Tranilast and Ketotifen Dose-Dependently Exert Mast Cell-Stabilizing Properties. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 1, p. 15-27, 2016.
- BABBE, H. et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. **J Exp Med**, v. 192, n. 3, p. 393-404, Aug 07 2000.
- BANKS, W. A. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 4, p. 275-92, Apr 2016.
- BARCLAY, W.; SHINOHARA, M. L. Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Brain Pathol**, v. 27, n. 2, p. 213-219, Mar 2017.
- BENNETT, J. L. et al. Bone marrow-derived mast cells accumulate in the central nervous system during inflammation but are dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. **J Immunol**, v. 182, n. 9, p. 5507-14, May 01 2009.
- BENNETT, M. L. et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 12, p. E1738-46, Mar 22 2016.

BETTELLI, E. et al. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Exp Med**, v. 200, n. 1, p. 79-87, Jul 05 2004.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 6, p. 849-60, Dec 2001.

BOGIE, J. F.; STINISSEN, P.; HENDRIKS, J. J. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. **Acta Neuropathol**, v. 128, n. 2, p. 191-213, Aug 2014.

BROWN, M. A.; HATFIELD, J. K. Mast Cells are Important Modifiers of Autoimmune Disease: With so Much Evidence, Why is There Still Controversy? **Front Immunol**, v. 3, p. 147, 2012.

BROWNE, P. et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, v. 83, n. 11, p. 1022-4, Sep 09 2014.

CAVONE, L. et al. Dysregulation of sphingosine 1 phosphate receptor-1 (S1P1) signaling and regulatory lymphocyte-dependent immunosuppression in a model of post-fingolimod MS rebound. **Brain Behav Immun**, v. 50, p. 78-86, Nov 2015.

CHEN, G.; SHANNON, M. Transcription factors and th17 cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Crit Rev Immunol**, v. 33, n. 2, p. 165-82, 2013.

CHEN, Z. et al. Role of Ketotifen on metabolic profiles, inflammation and oxidative stress in diabetic rats. **Endocr J**, Mar 17 2017.

CHENG, Y. et al. Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications. **J Neurosci Res**, Jan 13 2017.

CHIUSO-MINICUCCI, F. et al. Treatment with Vitamin D/MOG Association Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125836, 2015.

CHRISTY, A. L.; BROWN, M. A. The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity. **J Immunol**, v. 179, n. 5, p. 2673-9, Sep 01 2007.

CHRISTY, A. L. et al. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. **J Autoimmun**, v. 42, p. 50-61, May 2013.

COCLITU, C.; CONSTANTINESCU, C. S.; TANASESCU, R. The future of multiple sclerosis treatments. **Expert Rev Neurother**, v. 16, n. 12, p. 1341-1356, Dec 2016.

COLES, A. J. et al. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. **J Neurol**, v. 253, n. 1, p. 98-108, Jan 2006.

COMINI-FROTA, E. R. et al. Frequency of reported European ancestry among multiple sclerosis patients from four cities in the southern and southeastern regions of Brazil. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 115, n. 9, p. 1642-6, Sep 2013.

CONTI, P.; KEMPURAJ, D. Important role of mast cells in multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord**, v. 5, p. 77-80, Jan 2016.

COSTANZA, M.; COLOMBO, M. P.; PEDOTTI, R. Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 11, p. 15107-25, 2012.

CRAPS, L. P.; NEY, U. M. Ketotifen: current views on its mechanism of action and their therapeutic implications. **Respiration**, v. 45, n. 4, p. 411-21, 1984.

DAMAL, K.; STOKER, E.; FOLEY, J. F. Optimizing therapeutics in the management of patients with multiple sclerosis: a review of drug efficacy, dosing, and mechanisms of action. **Biologics**, v. 7, p. 247-58, 2013.

DAVIES, C. L.; MIRON, V. E. Distinct origins, gene expression and function of microglia and monocyte-derived macrophages in CNS myelin injury and regeneration. **Clin Immunol**, Jul 01 2016.

DE KOZAK, Y. et al. Pharmacological modulation of IgE-dependent mast cell degranulation in experimental autoimmune uveoretinitis. **Jpn J Ophthalmol**, v. 27, n. 4, p. 598-608, 1983.

DEJEAN, A. S. et al. Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. **Nat Immunol**, v. 10, n. 5, p. 504-13, May 2009.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 9, p. 545-58, Sep 15 2015.

DESHPANDE, P.; KING, I. L.; SEGAL, B. M. IL-12 driven upregulation of P-selectin ligand on myelin-specific T cells is a critical step in an animal model of autoimmune demyelination. **J Neuroimmunol**, v. 173, n. 1-2, p. 35-44, Apr 2006.

DEVONSHIRE, V. et al. Relapse and disability outcomes in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: subgroup analyses of the double-blind, randomised, placebo-controlled FREEDOMS study. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 5, p. 420-8, May 2012.

DI FILIPPO, M. et al. Persistent activation of microglia and NADPH oxidase [corrected] drive hippocampal dysfunction in experimental multiple sclerosis. **Sci Rep**, v. 6, p. 20926, Feb 18 2016.

DIETSCH, G. N.; HINRICHS, D. J. The role of mast cells in the elicitation of experimental allergic encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 142, n. 5, p. 1476-81, Mar 01 1989.

DIMITRIADOU, V.; PANG, X.; THEOHARIDES, T. C. Hydroxyzine inhibits experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and associated brain mast cell activation. **Int J Immunopharmacol**, v. 22, n. 9, p. 673-84, Sep 2000.

DONG, H. et al. Suppression of Brain Mast Cells Degranulation Inhibits Microglial Activation and Central Nervous System Inflammation. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 2, p. 997-1007, Mar 2017.

DUDECK, J. et al. Mast-Cell-Derived TNF Amplifies CD8(+) Dendritic Cell Functionality and CD8(+) T Cell Priming. **Cell Rep**, v. 13, n. 2, p. 399-411, Oct 13 2015.

DUMAS, A. et al. The inflammasome pyrin contributes to pertussis toxin-induced IL-1beta synthesis, neutrophil intravascular crawling and autoimmune encephalomyelitis. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 5, p. e1004150, May 2014.

EDWARDS, L. J. et al. Central inflammation versus peripheral regulation in multiple sclerosis. **J Neurol**, v. 258, n. 8, p. 1518-27, Aug 2011.

EL-HAGGAR, S. M.; FARRAG, W. F.; KOTKATA, F. A. Effect of ketotifen in obese patients with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Complications**, v. 29, n. 3, p. 427-32, Apr 2015.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; CAO, Y. Role of Mast Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Clin Rev Allergy Immunol**, Dec 26 2016.

FAUSTINO-ROCHA, A. I. et al. Mast Cells in Mammary Carcinogenesis: Host or Tumor Supporters? **Anticancer Res**, v. 37, n. 3, p. 1013-1021, Mar 2017.

FINN, D. F.; WALSH, J. J. Twenty-first century mast cell stabilizers. **Br J Pharmacol**, v. 170, n. 1, p. 23-37, Sep 2013.

FLETCHER, J. M. et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clin Exp Immunol**, v. 162, n. 1, p. 1-11, Oct 2010.

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

FURUZAWA-CARBALLEDA, J.; VARGAS-ROJAS, M. I.; CABRAL, A. R. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. **Autoimmun Rev**, v. 6, n. 3, p. 169-75, Jan 2007.

GALIMBERTI, D. et al. E-selectin A561C and G98T polymorphisms influence susceptibility and course of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 165, n. 1-2, p. 201-5, Aug 2005.

- GILDEN, D. H. Infectious causes of multiple sclerosis. **Lancet Neurol**, v. 4, n. 3, p. 195-202, Mar 2005.
- GLENN, J. D.; MOWRY, E. M. Emerging Concepts on the Gut Microbiome and Multiple Sclerosis. **J Interferon Cytokine Res**, v. 36, n. 6, p. 347-57, Jun 2016.
- GREGORY, G. D. et al. Mast cells are required for optimal autoreactive T cell responses in a murine model of multiple sclerosis. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 12, p. 3478-86, Dec 2005.
- GRIGORIADIS, N.; VAN PESCH, V.; PARADIG, M. S. G. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. **Eur J Neurol**, v. 22 Suppl 2, p. 3-13, Oct 2015.
- HAAS, J. et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 11, p. 3343-52, Nov 2005.
- HERSHKO, A. Y.; RIVERA, J. Mast cell and T cell communication; amplification and control of adaptive immunity. **Immunol Lett**, v. 128, n. 2, p. 98-104, Feb 16 2010.
- HOHLFELD, R. 'Gimme five': future challenges in multiple sclerosis. ECTRIMS Lecture 2009. **Mult Scler**, v. 16, n. 1, p. 3-14, Jan 2010.
- HOHLFELD, R.; MEINL, E. Ocrelizumab in multiple sclerosis: markers and mechanisms. **Lancet Neurol**, v. 16, n. 4, p. 259-261, Apr 2017.
- HONG, G. U. et al. Anti-CD40 Ab- or 8-oxo-dG-enhanced Treg cells reduce development of experimental autoimmune encephalomyelitis via down-regulating migration and activation of mast cells. **J Neuroimmunol**, v. 260, n. 1-2, p. 60-73, Jul 15 2013.
- HONG, G. U. et al. IgE and IgA produced by OX40-OX40L or CD40-CD40L interaction in B cells-mast cells re-activate FcepsilonRI or FcalphaRI on mast cells in mouse allergic asthma. **Eur J Pharmacol**, v. 754, p. 199-210, May 5 2015.
- HSU, D. Z. et al. Mast Cell Stabilizer Ketotifen Inhibits Gouty Inflammation in Rats. **Am J Ther**, v. 23, n. 4, p. e1009-15, Jul-Aug 2016.
- HUAN, J. et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 1, p. 45-52, Jul 1 2005.
- HUI, K. K.; YU, J. L. Ketotifen increases cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in intact human lymphocyte and potentiates other adenylate cyclase activating agents. **Life Sci**, v. 40, n. 13, p. 1259-65, Mar 30 1987.

HUNG, C. H. et al. Suppressive effects of ketotifen on Th1- and Th2-related chemokines of monocytes. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 18, n. 5, p. 378-84, Aug 2007.

HUPPERT, J. et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. **FASEB J**, v. 24, n. 4, p. 1023-34, Apr 2010.

KABRA, S. K. et al. Ketotifen for asthma in children aged 5 to 15 years: a randomized placebo-controlled trial. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 85, n. 1, p. 46-52, Jul 2000.

KAPPOS, L. et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 355, n. 11, p. 1124-40, Sep 14 2006.

KARAAVVAZ, M. et al. Levothyroxine versus ketotifen in the treatment of patients with chronic urticaria and thyroid autoimmunity. **J Dermatolog Treat**, v. 13, n. 4, p. 165-72, Dec 2002.

KARAGKOUNI, A.; ALEVIZOS, M.; THEOHARIDES, T. C. Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 10, p. 947-53, Aug 2013.

KAWAKAMI, N. et al. An autoimmunity odyssey: how autoreactive T cells infiltrate into the CNS. **Immunol Rev**, v. 248, n. 1, p. 140-55, Jul 2012.

KAWANO, Y. et al. Ketotifen inhibits allergen-specific T lymphocytes' responses by suppressing antigen presentation with concomitant decrease of HLA-DQ antigen on macrophages. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 14, n. 2, p. 69-79, Dec 1996.

KEIR, M. E.; FRANCISCO, L. M.; SHARPE, A. H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 3, p. 309-14, Jun 2007.

KIM, H. J. et al. Novel Suppressive Effects of Ketotifen on Migration and Invasion of MDA-MB-231 and HT-1080 Cancer Cells. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 22, n. 6, p. 540-6, Nov 2014.

KIM, M. S. et al. Mast cell stabilizer, ketotifen, prevents UV-induced wrinkle formation. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 4, p. 1104-7, Apr 2013.

KLINKERT, W. E. et al. TNF-alpha receptor fusion protein prevents experimental auto-immune encephalomyelitis and demyelination in Lewis rats: an overview. **J Neuroimmunol**, v. 72, n. 2, p. 163-8, Feb 1997.

KNOX, C. et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D1035-41, Jan 2011.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 566-73, Jul 1 2006.

KONDO, N. et al. Suppression of proliferative responses of lymphocytes to food antigens by an anti-allergic drug, ketotifen fumarate, in patients with food-sensitive atopic dermatitis. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 103, n. 3, p. 234-8, 1994.

KOZOVSKA, M. E. et al. Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. **Neurology**, v. 53, n. 8, p. 1692-7, Nov 10 1999.

LAI, D. S. et al. The comparison of the efficacy and safety of cetirizine, oxatomide, ketotifen, and a placebo for the treatment of childhood perennial allergic rhinitis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 89, n. 6, p. 589-98, Dec 2002.

LAMBIASE, A.; MICERA, A.; BONINI, S. Multiple action agents and the eye: do they really stabilize mast cells? **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 9, n. 5, p. 454-65, Oct 2009.

LAROCHELLE, C.; ALVAREZ, J. I.; PRAT, A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? **FEBS Lett**, v. 585, n. 23, p. 3770-80, Dec 01 2011.

LASSMANN, H.; BRADL, M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. **Acta Neuropathol**, v. 133, n. 2, p. 223-244, Feb 2017.

LEGROUX, L.; ARBOUR, N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 10, n. 4, p. 528-46, Dec 2015.

LINTHICUM, D. S.; MUNOZ, J. J.; BLASKETT, A. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. **Cell Immunol**, v. 73, n. 2, p. 299-310, Nov 01 1982.

LOPES PINHEIRO, M. A. et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 3, p. 461-71, Mar 2016.

LOSSIUS, A. et al. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis-association and causation. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3701-30, Dec 2012.

LOVETT-RACKE, A. E.; YANG, Y.; RACKE, M. K. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 2, p. 246-51, Feb 2011.

LV, S. et al. Tumour necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure. **Liver Int**, v. 30, n. 8, p. 1198-210, Sep 2010.

MARRIE, R. A. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 12, p. 709-18, Dec 2004.

MARTIN, R. Neutralisation of IL12 p40 or IL23 p40 does not block inflammation in multiple sclerosis. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 9, p. 765-6, Sep 2008.

MCKITTRICK, C. M.; LAWRENCE, C. E.; CARSWELL, H. V. Mast cells promote blood brain barrier breakdown and neutrophil infiltration in a mouse model of focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 35, n. 4, p. 638-47, Mar 31 2015.

MILO, R.; KAHANA, E. Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 5, p. A387-94, Mar 2010.

MONUMENT, M. J. et al. Neuroinflammatory Mechanisms of Connective Tissue Fibrosis: Targeting Neurogenic and Mast Cell Contributions. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 4, n. 3, p. 137-151, Mar 01 2015.

MOON, T. C. et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 2, p. 111-28, Mar 2010.

MURPHY, A. C. et al. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 4, p. 641-51, May 2010.

NELISSEN, S. et al. The role of mast cells in neuroinflammation. **Acta Neuropathol**, v. 125, n. 5, p. 637-50, May 2013.

NORI, M. et al. Ebastine inhibits T cell migration, production of Th2-type cytokines and proinflammatory cytokines. **Clin Exp Allergy**, v. 33, n. 11, p. 1544-54, Nov 2003.

PAN, W.; KASTIN, A. J. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. **Prog Neurobiol**, v. 83, n. 6, p. 363-74, Dec 2007.

PLUDOWSKI, P. et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 10, p. 976-89, Aug 2013.

POTHOULAKIS, C. et al. Ketotifen inhibits Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 105, n. 3, p. 701-7, Sep 1993.

PROCACCINI, C. et al. Animal models of Multiple Sclerosis. **Eur J Pharmacol**, v. 759, p. 182-91, Jul 15 2015.

RAO, R. M. et al. The S128R polymorphism of E-selectin mediates neuraminidase-resistant tethering of myeloid cells under shear flow. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 1, p. 251-60, Jan 2002.

RAWJI, K. S.; YONG, V. W. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 948976, 2013.

RODRIGUES, S. F.; GRANGER, D. N. Blood cells and endothelial barrier function. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 1-2, p. e978720, 2015.

RONCHI, F. et al. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1beta production by myeloid cells. **Nat Commun**, v. 7, p. 11541, May 18 2016.

ROSTAMI, A.; CIRIC, B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. **J Neurol Sci**, v. 333, n. 1-2, p. 76-87, Oct 15 2013.

ROTHHAMMER, V.; QUINTANA, F. J. Environmental control of autoimmune inflammation in the central nervous system. **Curr Opin Immunol**, v. 43, p. 46-53, Dec 2016.

ROY, M. et al. CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 18, Jan 23 2012.

RUSSI, A. E.; BROWN, M. A. The meninges: new therapeutic targets for multiple sclerosis. **Transl Res**, v. 165, n. 2, p. 255-69, Feb 2015.

RUSSI, A. E.; WALKER-CAULFIELD, M. E.; BROWN, M. A. Mast cell inflammasome activity in the meninges regulates EAE disease severity. **Clin Immunol**, Apr 21 2016.

RUSSI, A. E. et al. Meningeal mast cell-T cell crosstalk regulates T cell encephalitogenicity. **J Autoimmun**, v. 73, p. 100-10, Sep 2016.

SALIGRAMA, N. et al. Systemic lack of canonical histamine receptor signaling results in increased resistance to autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 191, n. 2, p. 614-22, Jul 15 2013.

SALOU, M. et al. Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. **Ann Clin Transl Neurol**, v. 2, n. 6, p. 609-22, Jun 2015.

SALOU, M. et al. Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis. **Front Immunol**, v. 6, p. 604, 2015.

SATHIYANADAN, K. et al. PSGL-1 and E/P-selectins are essential for T-cell rolling in inflamed CNS microvessels but dispensable for initiation of EAE. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 8, p. 2287-94, Aug 2014.

SAYED, B. A.; BROWN, M. A. Mast cells as modulators of T-cell responses. **Immunol Rev**, v. 217, p. 53-64, Jun 2007.

SCHENK, G. J.; DE VRIES, H. E. Altered blood-brain barrier transport in neuro-inflammatory disorders. **Drug Discov Today Technol**, v. 20, p. 5-11, Jun 2016.

SEGAL, B. M. et al. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 9, p. 796-804, Sep 2008.

SELMI, C. Autoimmunity in 2012. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 45, n. 2, p. 290-301, Oct 2013.

SILVER, R.; CURLEY, J. P. Mast cells on the mind: new insights and opportunities. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 9, p. 513-21, Sep 2013.

SINHA, S. et al. CD8(+) T-Cells as Immune Regulators of Multiple Sclerosis. **Front Immunol**, v. 6, p. 619, 2015.

SKAPER, S. D.; FACCI, L.; GIUSTI, P. Glia and mast cells as targets for palmitoylethanolamide, an anti-inflammatory and neuroprotective lipid mediator. **Mol Neurobiol**, v. 48, n. 2, p. 340-52, Oct 2013.

SNYMAN, J. R. et al. Effect of cetirizine, ketotifen and chlorpheniramine on the dynamics of the cutaneous hypersensitivity reaction: a comparative study. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 42, n. 4, p. 359-62, 1992.

SOELLNER, I. A. et al. Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clin Immunol**, v. 149, n. 3, p. 519-29, Dec 2013.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 683-747, 2005.

STUVE, O. et al. Pharmacological treatment of early multiple sclerosis. **Drugs**, v. 68, n. 1, p. 73-83, 2008.

SUURMOND, J. et al. Expansion of Th17 Cells by Human Mast Cells Is Driven by Inflammasome-Independent IL-1beta. **J Immunol**, v. 197, n. 11, p. 4473-4481, Dec 01 2016.

TANG, Q. et al. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 11, p. 2996-3005, Nov 2004.

TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Mast cells in allergy and host defense. **Allergy Asthma Proc**, v. 22, n. 3, p. 115-9, May-Jun 2001.

TREMLET, H. et al. The gut microbiome in human neurological disease: A review. **Ann Neurol**, v. 81, n. 3, p. 369-382, Mar 2017.

TZARTOS, J. S. et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am J Pathol**, v. 172, n. 1, p. 146-55, Jan 2008.

VARATHARAJ, A.; GALEA, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. **Brain Behav Immun**, v. 60, p. 1-12, Feb 2017.

VASCONCELOS, C. C. et al. Multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 151, p. 24-30, Dec 2016.

VENKEN, K. et al. 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**, v. 180, n. 9, p. 6411-20, May 01 2008.

WADE, L.; BIELORY, L.; RUDNER, S. Ophthalmic antihistamines and H1-H4 receptors. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 12, n. 5, p. 510-6, Oct 2012.

WALKER-CAULFIELD, M. E.; HATFIELD, J. K.; BROWN, M. A. Dynamic changes in meningeal inflammation correspond to clinical exacerbations in a murine model of relapsing-remitting multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 278, p. 112-22, Jan 15 2015.

WALKER, M. E.; HATFIELD, J. K.; BROWN, M. A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 1, p. 57-65, Jan 2012.

WANG, Z. et al. Immunoglobulin E and mast cell proteases are potential risk factors of human pre-diabetes and diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28962, 2011.

WEKERLE, H. The gut-brain connection: triggering of brain autoimmune disease by commensal gut bacteria. **Rheumatology (Oxford)**, v. 55, n. suppl 2, p. ii68-ii75, Dec 2016.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 7, p. 478-94, Jul 2014.

WILHELM, M.; SILVER, R.; SILVERMAN, A. J. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 2238-48, Nov 2005.

WILSON, E. H.; WENINGER, W.; HUNTER, C. A. Trafficking of immune cells in the central nervous system. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1368-79, May 2010.

WING, K. et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 271-5, Oct 10 2008.

WOJKOWSKA, D. W. et al. Interactions between neutrophils, Th17 cells, and chemokines during the initiation of experimental model of multiple sclerosis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 590409, 2014.

WORBS, T.; HAMMERSCHMIDT, S. I.; FORSTER, R. Dendritic cell migration in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 1, p. 30-48, Jan 2017.

YANG, C. Y. et al. The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 45, n. 2, p. 217-26, Oct 2013.

YU, X.; KASPRICK, A.; PETERSEN, F. Revisiting the role of mast cells in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 9, p. 751-9, Sep 2015.

ZHANG, X. et al. Induction of Microglial Activation by Mediators Released from Mast Cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 4, p. 1520-31, 2016.