

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA –
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Elaine Carlos Scherrer Ramos

O efeito imunomodulador de derivados do ácido ursólico nos modelos murinos de edema de pata e encefalomielite autoimune experimental

Governador Valadares

2023

Elaine Carlos Scherrer Ramos

O efeito imunomodulador de derivados do ácido ursólico nos modelos murinos de edema de pata e encefalomielite autoimune experimental

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares à obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro - PMBqBM

Coorientador: Prof. Dr. Caio César Souza Alves - UFVJM

Governador Valadares

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ramos, Elaine Carlos Scherrer Ramos.

O efeito imunomodulador de derivados do ácido ursólico nos modelos murinos de edema de pata e encefalomielite autoimune experimental / Elaine Carlos Scherrer Ramos Ramos. -- 2023. 171 f.

Orientadora: Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Coorientadora: Caio César Souza Alves

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

1. Inflamação. 2. Esclerose Múltipla. 3. EAE. 4. Ácido ursólico. I. Castro, Sandra Bertelli Ribeiro de, orient. II. Alves, Caio César Souza, coorient. III. Título.

Elaine Carlos Scherrer Ramos

O efeito imunomodulador de derivados do ácido ursólico nos modelos murinos de edema de pata e encefalomielite autoimune experimental

Dissertação
apresentada ao
Programa
Multicêntrico de
pós-graduação em
Bioquímica e
Biologia Molecular
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Doutora em
Bioquímica e
Biologia Molecular.
Área de
concentração: Bioquímica
e Biologia Molecular.

Aprovada em 08 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Flávia Márcia de Castro Silva
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Profa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Ana Cândida Araújo Silva

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Juiz de Fora, 04/10/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, Usuário Externo**, em 08/11/2023, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavia Marcia de Castro e Silva, Usuário Externo**, em 08/11/2023, às 18:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANA CANDIDA ARAUJO E SILVA, Usuário Externo**, em 08/11/2023, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucia Alves de Oliveira Fraga, Professor(a)**, em 08/11/2023, às 18:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ujfj (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1510225** e o código CRC **1DC03BEE**.

Dedico este trabalho ao meu Deus, o autor da minha vida, por ter me possibilitado estar firme durante toda essa trajetória. Sem Ele, não poderia estar aqui agradecendo a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO

A minha mãe Aírvia e meu irmão Almir, que sempre acreditaram em minha capacidade.

Ao meu esposo, Edmilson, que esteja sempre a meu lado, seu companheirismo, amizade, paciência e amor, foram essenciais para a concretização deste sonho.

Aos meus filhos, Lucas e Sarah, pela paciência e compreensão com minha ausência durante a elaboração desta tese e no transcorrer do doutorado. Vocês são minha inspiração e espero inspirá-los também com meu exemplo.

A minha orientadora Sandra Bertelli e ao meu coorientador Caio César, por compartilhar conhecimento, pelo incentivo e inestimável orientação que possibilitou o meu crescimento científico.

Aos amigos que Deus colocou em minha vida durante o doutorado. Em especial a Karla Antunes, por tornar os meus dias em Teófilo Otoni mais leves durante o tempo que precisei ficar distante da minha família para realizar os experimentos. Ao Dr. Daniel Alvarenga que me acolheu no momento de desespero com as lâminas histológicas.

Aos meus amigos da UNIVALE, que compartilharam comigo esses momentos. Em especial Layla, Lourimar, Marluce e Rafael. Agradeço pela amizade, pelo companheirismo e pelas palavras de apoio nos momentos difíceis.

Aos meus alunos, que me acompanharam, me incentivaram e torceram por mim.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG e a Universidade Federal de Juiz de Fora pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram e que estiveram presentes durante o doutorado.

RESUMO

A inflamação é uma resposta protetora natural do corpo desencadeada por células específicas do organismo em resposta às infecções ou danos celulares, para garantir a remoção de estímulos prejudiciais. Contudo, uma resposta inflamatória em longo prazo tem um efeito prejudicial e desempenha um papel crítico no desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias crônicas. Acredita-se que intervenções no processo inflamatório sejam potencial alvo terapêutico para reduzir o risco de doenças, muitas vezes incapacitantes como a Esclerose Múltipla. O uso de modelos murinos experimentais de doenças inflamatórias são importantes para a avaliação do potencial imunomodulador de novas substâncias com potencial terapêutico. Dentro deste contexto, a indução de edema em patas de camundongos pela carragenina, por exemplo, é um modelo experimental amplamente utilizado para testar a atividade anti-inflamatória de novas substâncias, onde a inflamação aguda é associada com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Já na avaliação de um processo inflamatório crônico e de caráter autoimune, destaca-se a encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo animal utilizado para o estudo da Esclerose Múltipla, doença inflamatória crônica, de origem autoimune, caracterizada pela inflamação, desmielinização, perda axonal e gliose. Sabe-se ainda que o ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico denominado ácido ursólico (AU), um composto triterpenóide amplamente encontrado na natureza apresenta atividade anti-inflamatória. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito imunomodulador dos derivados do ácido ursólico: 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1) e o 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2) nos modelos murinos de edema de pata induzido por carragenina e de encefalomielite autoimune experimental (EAE). No modelo de edema de pata induzido por carragenina, foi avaliada a redução do edema na pata e os níveis de IL-6 em macerados de patas e linfonodos dos camundongos BALB/c fêmeas que receberam tratamentos com AU, AUD1 ou AUD2 (200mg/kg i.p.), tinta minutos antes da indução do modelo. No modelo EAE, foi investigado o uso de AU e seus derivados AUD1 e AUD2 na evolução da doença induzida em camundongos C57BL/6 fêmeas através da aplicação do MOG₃₅₋₅₅. No 15º dia após a indução com o MOG, os camundongos foram tratados com AU, AUD1 ou AUD2 (50 mg/kg i.p. por dia) por seis dias. Os parâmetros foram avaliados na medula espinhal, linfonodos e cérebro no 21º dia após indução e os sinais clínicos acompanhados até o 21º dia após indução. Os resultados mostraram uma significativa redução do edema de pata, acompanhada de uma redução dos níveis da citocina pró-inflamatória de IL-6 no

sobrenadante dos macerados de pata e linfonodos, nos grupos tratados com AU, AUD1 e AUD2. No contexto do modelo de inflamação aguda, tanto o AUD1 quanto o AUD2 demonstraram eficácia comparável à dexametasona, um anti-inflamatório amplamente utilizado na prática clínica. Os tratamentos com AUD1 e AUD2, atenuaram os sinais clínicos da EAE, de maneira similar, com a redução no número de células CD11c+MHC-II+, CD11c+CD80+, CD11c+CD86+, CD4+, CD8+, CD4+IL-17+ e CD4+IFN γ + no cérebro e redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α na medula. No entanto, na periferia, enquanto o AUD2 inibiu o número de células CD11c+MHC-II+, CD11c+CD80+, CD11c+CD86+, CD4+, CD8+, CD4+IL-17+ e CD4+IFN γ +, o AUD1 promoveu um aumento no número de células reguladoras CD4+ FOXP3+ IL-10+ e uma redução no número de células CD4+, CD8+, CD4+IL-17+. Em conclusão, no modelo EAE, a regulação das células imunológicas na periferia e a redução no número de células pró-inflamatórias no SNC com os tratamentos com AUD1 e AUD2 se correlacionaram com melhores aspectos histológicos no SNC que culminaram com eficácia sobre os parâmetros clínicos apresentados na EAE, sugerindo um potencial terapêutico no tratamento da EM.

Palavras chaves: Inflamação. Esclerose Múltipla. EAE. Ácido ursólico.

ABSTRACT

Inflammation is a natural protective response of the body triggered by specific cells in the body in response to infections or cellular damage, to ensure the removal of harmful stimuli. However, a long-term inflammatory response has a detrimental effect and plays a critical role in the development of several chronic inflammatory diseases. It is believed that interventions in the inflammatory process are a potential therapeutic target to reduce the risk of diseases, which are often disabling, such as Multiple Sclerosis. The use of experimental murine models of inflammatory diseases is important for evaluating the immunomodulatory potential of new substances with therapeutic potential. Within this context, the induction of edema in mouse paws by carrageenan, for example, is an experimental model widely used to test the anti-inflammatory activity of new substances, where acute inflammation is associated with increased levels of pro-inflammatory cytokines. Inflammation. In the evaluation of a chronic inflammatory process of an autoimmune nature, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) stands out, an animal model used to study Multiple Sclerosis, a chronic inflammatory disease of autoimmune origin, characterized by inflammation, demyelination, loss axonal and gliosis. It is also known that 3 β -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid called ursolic acid (AU), a triterpenoid compound widely found in nature, has anti-inflammatory activity. Therefore, the present work aimed to evaluate the immunomodulatory effect of UA and its derivatives methyl 3 β -hydroxy-urs-12-en-28-oate (AUD1) and 3 β -acetoxy-urs-12-en-28 -methyl oate (AUD2) in murine models of carrageenan-induced paw edema and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In the carrageenan-induced paw edema model, the reduction of paw edema and IL-6 levels in paw macerates and lymph nodes of female BALB/c mice that received treatments with AU, AUD1 or AUD2 (200mg/kg i.p.) 15 minutes before model induction. In the EAE model, the use of AU and its derivatives AUD1 and AUD2 in the evolution of the disease induced in female C57BL/6 mice through the application of MOG₃₅₋₅₅ was investigated. On the 15th day after MOG induction, mice were treated with AU, AUD1 or AUD2 (50 mg/kg i.p.) for six days. Parameters were evaluated in the spinal cord, lymph nodes and brain on the 21st day after induction and clinical signs were monitored until the 21st day after induction. The results showed a significant reduction in paw edema, accompanied by a reduction in the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 in the supernatant of paw macerates and lymph nodes, in the groups treated with AU, AUD1 and AUD2. In the context of the acute inflammation model,

both AUD1 and AUD2 demonstrated comparable efficacy to dexamethasone, an anti-inflammatory widely used in clinical practice. Treatments with AUD1 and AUD2 attenuated the clinical signs of EAE, in a similar way, with a reduction in the number of cells CD11c+MHC-II+, CD11c+CD80+, CD11c+CD86+, CD4+, CD8+, CD4+IL-17+ and CD4+IFN γ + in the brain and reduction of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in the bone marrow. However, in the periphery, while AUD2 inhibited the number of CD11c+MHC-II+, CD11c+CD80+, CD11c+CD86+, CD4+, CD8+, CD4+IL-17+ and CD4+IFN γ + cells, AUD1 promoted an increase in number of regulatory CD4+FOXP3+IL-10+ cells and a reduction in the number of CD4+, CD8+, CD4+IL-17+ cells. In conclusion, in the EAE model, the regulation of immune cells in the periphery and the reduction in the number of pro-inflammatory cells in the CNS with treatments with AUD1 and AUD2 correlated with better histological aspects in the CNS that culminated in efficacy on the clinical parameters presented. in EAE, suggesting a therapeutic potential in the treatment of MS.

Keywords: Inflammation. Multiple Sclerosis. EAE. Ursolic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Inflamação aguda versus crônica.....	25
Figura 2 - Desregulação do sistema imunológico fora do SNC na EM.	32
Figura 3 - Mecanismos imunopatológicos no desensolvimento da EM no SNC.	33
Figura 4 - Polarização da microglia na EM.....	34
Figura 5 - Cursos clínicos da EM.....	36
Figura 6 - Mecanismos de ação das terapias para EM.....	39
Figura 7 - Estrutura química do ácido ursólico.	42
Figura 8 - Derivados semissintéticos de ácido ursólico (AU): 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato (AUD1), 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2).	46
Figura 9 - Delineamento experimental do experimento de edema de pata induzidos por carragenina.	48
Figura 10 - Delineamento experimental do experimento do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	51
Figura 11 - Edema de pata induzido por carragenina.	56
Figura 12 - Concentração da citocina IL-6 no sobrenadante do homogenato em linfonodos inguinais e de tecido de pata.....	58
Figura 13 - Média do escore clínico e massa corporal	60
Figura 14 - Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes longitudinais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	62
Figura 15 - Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	63
Figura 16 - Escore de inflamação de cortes longitudinais e transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	64
Figura 17 - Análise histológica através da coloração de luxol fast blue de cortes longitudinais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21° dia pós indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	65
Figura 18 - Análise histológica através da coloração de luxol fast blue de cortes transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21° dia pós indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	66

Figura 19 - Escore de desmielinização de cortes longitudinais e transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	67
Figura 20 - Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes longitudinais do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21° dia pós indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	68
Figura 21 - Escore de inflamação de cortes longitudinais do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	69
Figura 22 - Concentração das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C), TNF- α (D), IFN- γ (E) e IL-10 (F) determinada no sobrenadante do homogenato da medula espinhal por ELISA no 21° dia pós indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	71
Figura 23 - Número absoluto de células CD11c+MHCII+(A), CD11c+CD80+(B) e CD11c+CD86+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	73
Figura 24 - Número absoluto de células CD4+(A) e CD8+(B) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	74
Figura 25 - Número absoluto de células CD4+IL-17+(A), CD4+IFN γ +(B) e CD4+CD25+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	75
Figura 26 - Número absoluto de células CD4+IL-10+FOXP3+ determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	76
Figura 27 - Número absoluto de células CD11c+MHCII+(A), CD11c+CD80+(B) e CD11c+CD86+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	78
Figura 28 - Número absoluto de células CD4+(A) e CD8+(B) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais no 21° dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	79
Figura 29 - Número absoluto de células CD4+IL-17+(A), CD4+IFN γ +(B) e CD4+CD25+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais no 21° dia após a indução com peptídeo	

MOG ₃₅₋₅₅	80
Figura 30 - Número absoluto de células CD4+IL-10+FOXP3+ determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais no 21º dia após a indução com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos terapêuticos para EM.....	37
Tabela 2 - Caracterização dos grupos de camundongos para modelo de edema de pata ..	47
Tabela 3 - Caracterização dos grupos de camundongos para a indução da EAE.....	50
Tabela 4 - Escala score clínico para avaliar a EAE.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABEM: Associação Brasileira de Esclerose Múltipla
- ADP: Adenosina trifosfato
- AG: Acetato de Glatirâmer
- AIES: Anti-inflamatórios esteroides
- AINES: Anti-inflamatórios não esteroides
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APA: Área de Proteção Ambiental
- APCs: Células apresentadoras de antígenos
- AU: ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico - Ácido ursólico
- AUD1: 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato
- AUD2: 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila
- BHE: Barreira Hematoencefálica
- CBR-UFMG: Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Minas Gerais
- CCL: CC *chemokine ligands*
- CCR: C-C *chemokine receptor*
- CEUA: Comissão de Ética na Utilização de Animais
- CFA: Adjuvante de Freund
- CFA: *Freund's Complete Adjuvant* - Adjuvante completo de Freund
- CIS: Síndrome Clinicamente Isolada
- CIS: Síndrome Clinicamente Isolada
- COX: Ciclo-oxigenase
- COX-1: Ciclooxigenase-1
- COX-2: Ciclooxigenase-2
- COX-3: Ciclooxigenase-3
- CP: Cisplatina
- CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* - Antígeno 4 associado à linfócito T citotóxico
- DAMPs: Padrões moleculares associados a danos
- DCC: Diciclohexilcarbodiimida
- DIS: Disseminação no espaço
- DIT: Disseminação no tempo

DMAP: Dimetilaminopiridina
DMARDs: Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença
DMF: Dimetilformamida
DMF: Fumarato de dimetila
DMSO: Dimetilsulfóxido
DMTs: Terapias modificadoras da doença
EAE: Encefalomielite autoimune experimental
EDSS: Escala expandida do estado de incapacidade
EDTA: Ácido etileno diamino tetracético
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EM: Esclerose múltipla
EMPP: Esclerose Múltipla Primária Progressiva
EMRR: Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
EMSP: Esclerose Múltipla Secundária Progressiva
ER: Receptor para estradiol
FAMMUC-UFVJM: Faculdade de Medicina da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
FDA: *Food and Drug Administration*
Foxp3: Fator de transcrição *forkhead box P3*
H&E: Hematoxilina e eosina
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HBV: Vírus da hepatite B
HE: Hematoxilina e eosina
HLA: Antígeno leucocitário humano
i.p: Intraperitoneal
ICAM - 1: Molécula de adesão intercellular - 1
ICAM: Molécula de adesão intracelular
IFN: Interferon
IFN- α : Interferon alfa
IFN- β : Interferon beta
IFN- γ : Interferon gama
Ig: Imunoglobulina
IgG: Imunoglobulina G
IL: Interleucina

IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-12p70: Interleucina 12 subunidade 70
IL-17: Interleucina 17
IL-23: Interleucina 23
IL-6: Interleucina 6
iNOS: Óxido nítrico-sintase induzível
KO: Nocaute
LCR: Líquido cefalorraquidiano
LFB: *Luxol fast blue*
L-NMMA: NG- monometil-L-arginina
LPS: Lipopolissacarídeo
LTC4: Leucotrienos C4
M1: Macrófagos classicamente ativados
M2: Macrófagos alternativamente ativados
MAG: Glicoproteína associada á mielina
MAPK p38: P38 *mitogen-activated protein kinases* - Proteína quinase ativada por mitógeno p38
MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1
MG: Minas gerais
MHC: Complexo de histocompatibilidade principal
MMP-9: Metaloproteinase 9
MOG: Glicoproteína mielínica de oligodendrócito
MTT: Corante thiazol blue tetrazolium bromido
NF-kB: Fator nuclear kappa B
NK: *Natural Killer*
NO: Óxido nítrico
NOS: *Nitric oxide synthases*
NTZ: Natalizumabe
OMS: Organização Mundial de Saúde
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
PBM: Proteína básica da mielina
PBS: Solução tampão fosfato

PBS-T: Salina tamponada com fosfato e Tween 20

PE: Ficoeritrina

PerCP: Peridina-clorofilproteína

PLP: Proteína proteolípica da mielina

PP: Primária-progressiva

PR: Progressiva-recorrente

PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões

RIS: Síndrome Radiologicamente Isolada

RM: Ressonância magnética

ROR t: - Fator de transcrição envolvido em resposta imunitária adquirida

rpm: Rotações por minuto

RR: Remitente-recorrente

s.c: Subcutânea

SFB: Soro fetal bovino

SNC: Sistema Nervoso Central

SNPs: Polimorfismos de nucleotídeo único

SP: Secundária-progressiva

STAT: Gene transdutor de sinal e ativador da transcrição

T-bet: Fator de transcrição

TCR: Receptor de célula T

TGF- β : *Transforming growth factor* beta - Fator Beta de Transformação de Crescimento

Th1: Células T auxiliares do tipo 1

Th17: Células T auxiliares do tipo 17

Th2: Células T auxiliares do tipo 2

TJ: *Tight junction*

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

Tregs: Linfócitos T reguladores

VCAM-1: Molécula de Adesão de Células Vasculares-1

VLA-4: Integrina Alfa 4 Beta

LISTA DE SÍMBOLOS

α Letra grega minúscula Alfa.

β Letra grega minúscula Beta.

γ Letra grega minúscula Gama.

m Letra árabe minúscula Eme que representa o prefixo mili, equivalente a 10^3 .

μ Letra grega minúscula Mi que representa o prefixo micro, equivalente a 10^6 .

η Letra grega minúscula Eta que representa o prefixo nano, equivalente a 10^9 .

k Letra árabe minúscula Ka que representa o prefixo kilo, equivalente a 10^3 .

Da Representação de unidade de massa atômica: Dalton.

g Letra árabe minúscula Gê que representa uma unidade de massa: grama.

M Letra árabe maiúscula Eme que representa a quantidade de matéria do soluto por litro da solução: mol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 INFLAMAÇÃO.....	23
2.2 TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS.....	27
2.3 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM).....	29
2.4 ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE).....	39
2.5 ÁCIDO URSÓLICO (AU).....	41
3 HIPÓTESE.....	44
4 OBJETIVOS.....	45
4.1 OBJETIVO GERAL.....	45
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
5.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS DO ÁCIDO URSÓLICO.....	46
5.2 ANIMAIS PARA EXPERIMENTO DE EDEMA COM CARRAGENINA.....	46
5.3 INDUÇÃO DE EDEMA DE PATA POR CARRAGENINA E TRATAMENTO COM AU E SEUS DERIVADOS AUD1 E AUD2.....	47
5.4 EUTANASIA E COLETA DE TECIDOS DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA.....	48
5.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA.....	48
5.6 ANIMAIS PARA EXPERIMENTO DE EAE.....	49
5.7 INDUÇÃO DO MODELO DE EAE E TRATAMENTO COM AU E SEUS DERIVADOS.....	49
5.8 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE.....	51
5.9 EUTANASIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS E TECIDOS DO EXPERIMENTO DE EAE.....	52

5.10 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA DO EXPERIMENTO DE EAE	52
5.11 ISOLAMENTO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DOS LINFONODOS INGUINAIS E CÉREBRO DO EXPERIMENTO DE EAE.....	53
5.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO DO EXPERIMENTO DE EAE	54
5.13 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA DO EXPERIMENTO DE EAE	54
5.14 COLORAÇÃO POR <i>LUXOL FAST BLUE</i> DO EXPERIMENTO DE EAE	55
5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
6 RESULTADOS	56
6.1 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM OS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	56
6.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA IL-6 NO SOBRENADANTE DO HOMOGENATO DO TECIDO DA PATA E DOS LINFONODOS INGUINAIS	57
6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE	59
6.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE	61
6.5 ESCORE DE INFLAMAÇÃO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE	64
6.6 AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA DESMIELINIZAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL COM EAE.....	65
6.7 ESCORE DE DESMIELINIZAÇÃO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE	66
6.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO CÉREBRO DOS ANIMAIS COM EAE	68
6.9 ESCORE DE INFLAMAÇÃO NO CÉREBRO DOS ANIMAIS COM EAE	69
6.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA	

CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS IL-1 β , IL-6, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , IL-10 NO SOBRENADANTE DO HOMOGENATO DA MEDULA ESPINHAL POR ELISA NO 21ºDIA APÓS A INDUÇÃO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE	70
6.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 e AUD2 NA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES EM CÉLULAS DO CÉREBRO POR CITOMETRIA DE FLUXO NO 21ºDIA APÓS A INDUÇÃO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE	72
6.12 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES EM CÉLULAS DO LINFONODO POR CITOMETRIA DE FLUXO NO 21º DIA APÓS A INDUÇÃO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE	77
7 DISCUSSÃO	82
8 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO A - Protocolo nº 03-2018R.....	102
ANEXO B - Protocolo nº04-2019R.....	103
ANEXO C - Publicação de artigo	104
ANEXO D - Publicação de capítulo de livro	116
ANEXO E - Submissão de artigo.....	147

1 INTRODUÇÃO

A inflamação constitui um mecanismo fisiológico natural do corpo, desencadeado por células específicas do organismo em resposta a infecções causadas por patógenos ou danos nos tecidos. Seu principal propósito é remover elementos específicos e restabelecer a homeostase. A fase inicial da resposta inflamatória é geralmente aguda e caracteriza-se por uma série de reações, incluindo a dilatação dos vasos sanguíneos, o recrutamento de células do sistema imunológico e proteínas plasmáticas para o local da infecção ou lesão tecidual (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; NYATI *et al.*, 2017; ZSIROS; KISS, 2020; SERHAN *et al.*; 2020; KISS, 2022). Para uma resposta inflamatória apropriada e eficaz, é necessária uma regulação cuidadosa de mediadores pró-inflamatórios, já que uma resposta excessiva pode causar lesão no tecido hospedeiro e doenças inflamatórias crônicas. Estudos tem demonstrado que o estabelecimento de uma inflamatória crônica está intimamente associado a muitas doenças inflamatórias crônicas, especialmente em doenças autoimunes (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; NYATI *et al.*, 2017; ZSIROS; KISS, 2020; SERHAN *et al.*; 2020; KISS, 2022).

As doenças autoimunes que impactam o sistema nervoso central (SNC) representam significativas fontes de morbidade e mortalidade, além de estarem associadas a um considerável ônus econômico. A esclerose múltipla (EM) é a mais prevalente e amplamente pesquisada entre as doenças autoimunes que afetam o SNC (NAGHAVI, 2019; ALBERTI; HANDEL, 2020). Acredita-se que intervenções no processo inflamatório sejam potencial alvo terapêutico para reduzir o risco de doenças, muitas vezes incapacitantes, como por exemplo a EM (CHEN *et al.*, 2017; THOMPSON *et al.*, 2018a).

A EM é uma doença autoimune inflamatória crônica, caracterizada por desmielinização, glioses e degeneração axonal no SNC, mediada principalmente, por linfócitos T auto-reativos que respondem a auto-antígenos do SNC. A EM é marcada por regiões multifocais de desmielinização, perda axonal, morte de oligodendrócitos e cicatrizes astrogliais que resultam em déficit da função neurológica (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; LASSMANN, 2018).

O uso de modelos murinos experimentais de doenças inflamatórias são importantes para a avaliação do potencial imunomodulador de novas substâncias com potencial terapêutico. Nesse contexto, a indução de edema em patas de camundongos pela carragenina, por exemplo, é um modelo experimental amplamente utilizado para testar a atividade anti-inflamatória de novas substâncias, em que a inflamação aguda é associada

ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (MANSOURI *et al.*, 2015; HUDAYA; HARDIAN, 2019).

Na avaliação de um processo inflamatório crônico e de caráter autoimune destaca-se a encefalomielite autoimune experimental (EAE). Trata-se de um modelo mediado por células T com uma ativação periférica e subsequente aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, com dano efetor no Sistema Nervoso Central (SNC) (HASSELMANN *et al.*, 2017; AHARONI *et al.*, 2021; HUNTEMANN *et al.*, 2022). Sabe-se que células Th1 e Th17 ativadas são as principais responsáveis pela EAE e EM. Os linfócitos Th1 produzem principalmente IFN- γ , enquanto Th17 são linfócitos T produtores de IL-17 (CONSTANTINESCU *et al.*, 2011; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

O desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento da EM é relevante, pelo caráter incapacitante da doença, afetando principalmente adultos jovens, entre 20 a 40 anos (WALTON *et al.*, 2020). Sabe-se que, as terapias disponíveis para o tratamento da EM promovem uma série de efeitos colaterais e possuem eficácia limitada, sendo estas incapazes de promover a cura da doença. Além disso, as terapias para tratar os pacientes com EM impõem um desafio aos orçamentos de saúde (DARGAHI *et al.*, 2017; BUC, 2018; MAIA DINIZ *et al.*, 2018; BURMAN, 2021; ŚLADOWSKA *et al.*, 2022).

Ao longo das últimas décadas, a descoberta de novos potenciais terapêuticos a partir de produtos naturais, especialmente os anti-inflamatórios, tem avançado significativamente (NEWMAN; CRAGG, 2020). Neste contexto, estudos têm sido realizados com o ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico denominado ácido ursólico (AU), obtido a partir da extração e da purificação de diversas espécies vegetais. Como resultado, o AU apresentou múltiplos alvos intracelulares e extracelulares destacando-se por sua atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, entre outras (KASHYAP; TULI; SHARMA, 2016; CARGNIN; GNOATTO, 2017; RAMOS-HRYB *et al.*, 2017; SEO *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2021; RENDA; GÖKKAYA; ŞÖHRETOĞLU, 2021). Além disso, a literatura tem evidenciado o potencial terapêutico do AU em doenças em distúrbios neuro-inflamatórios (RAMOS-HRYB *et al.*, 2017; RAI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2021; SALAU *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2022). Desta forma, torna-se relevante estudar possíveis efeitos imunomodulatórios dos derivados do ácido ursólico (AU): 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1) e o 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2) sobre a resposta inflamatória em modelos animais de inflamação aguda e inflamação crônica.

Por isso esse trabalho foi realizado a fim de avaliar o efeito imunomodulador dos

derivados do ácido ursólico: 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1) e o 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2) nos modelos murinos de edema de pata e de encefalomielite autoimune experimental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INFLAMAÇÃO

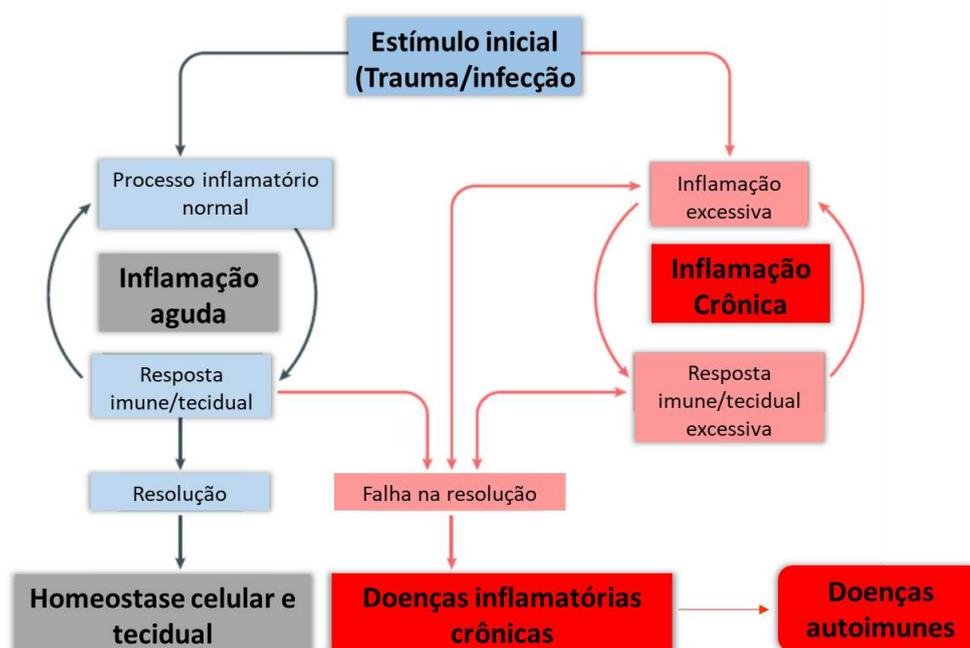
A inflamação é uma defesa fisiológica normal do corpo desencadeada por células específicas do organismo contra infecções por patógenos e danos nos tecidos, para garantir a remoção de estímulos prejudiciais e restauração da homeostase. Inicialmente caracterizada por uma série de reações, incluindo vasodilatação, recrutamento de células imunes e proteínas plasmáticas para o local da infecção ou lesão tecidual, sendo benéficas para o hospedeiro quando resolvida em tempo hábil (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; NYATI *et al.*, 2017; ZSIROS; KISS, 2020; SERHAN *et al.*; 2020; KISS, 2022).

Os sinais clínicos da inflamação em nível tecidual são caracterizados por vermelhidão, inchaço, calor, dor e perda da função do tecido. Esses sinais que ocorrem durante o processo inflamatório são decorrentes de mediadores inflamatórios que atuam sobre o músculo liso vascular para causar vasodilatação, e sobre células endoteliais para aumentar a permeabilidade vascular. O aumento da permeabilidade vascular permite o fluxo transvascular de fluido rico em proteínas plasmáticas dos compartimentos intravasculares para o tecido, formando o edema característico dos processos inflamatórios agudos (NEWTON; DIXIT, 2012; CHEN *et al.*, 2017; NETEA *et al.*, 2017; FURMAN *et al.*, 2019).

Um outro fenômeno que ocorre como resultado da produção local de mediadores inflamatórios é a migração celular de leucócitos para o local da injúria. Esses mediadores inflamatórios apresentam atividade quimiotática e induzem alterações das proteínas de membrana do endotélio vascular, facilitando o rolamento dos leucócitos sobre a parede endotelial, adesão às células endoteliais e, finalmente, a transmigração e acúmulo no local de injúria. Em conjunto, a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão atuam no sentido de promover o efluxo de plasma e o recrutamento de leucócitos circulantes ao local onde encontra-se o agente agressor (NETEA *et al.*, 2017; ZSIROS; KISS, 2020; KISS., 2022).

A primeira linha de defesa na inflamação conta com o sistema imune inato e uma grande família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que detectam estruturas distintas evolutivamente conservadas em patógenos, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PRRs também reconhecem padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que são moléculas liberadas por células necróticas e tecidos danificados. Entre os PRRs, os receptores mais descritos na literatura são os do tipo *Toll-like* (TLRs). Após o envolvimento do PAMPs e DAMPs, os PRRs desencadeiam cascatas de sinalização intracelular que culminam na expressão de uma variedade de moléculas pró-inflamatórias, que juntas orquestram a resposta inicial do hospedeiro à infecção e também são um pré-requisito para a ativação e modelagem subsequentes da imunidade adaptativa. Para evitar imunopatologias, esse sistema é rigidamente regulado por várias moléculas endógenas que limitam a magnitude e a duração da resposta inflamatória (NEWTON; DIXIT, 2012; NETEA *et al.*, 2017; KATZ; ZSIROS; KISS, 2019; BEKKERING, S. *et al.*; 2021).

Essa resposta pode ser uma inflamação aguda como mecanismo de defesa imediato desencadeada pelos estímulos nocivos que iniciam uma cascata de sinalização, ativando leucócitos, que então produzem e liberam citocinas inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (KANG *et al.*; 2019; UCIECHOWSKI; DEMPKE, 2020). Essas citocinas interagem com seus receptores IL-1R, IL-6R e TNFR, mediando o processo inflamatório. A ativação dos receptores desencadeia a fosforilação de várias moléculas de sinalização, como fator nuclear kappa-B (NF- κ B), resultando na ativação de vários genes. Essa ativação coordenada por moléculas sinalizadoras regula o nível de mediadores inflamatórios nas células teciduais residentes e recruta células inflamatórias do sangue (KATZ; ZSIROS; KISS, 2019). Assim a inflamação aguda é um mecanismo protetor, que remove os estímulos lesivos e inicia um processo de cicatrização, restabelecendo assim a homeostase do organismo. Se ocorrer uma falha na resolução da resposta inflamatória aguda e a inflamação persistir por um longo período de tempo, é desencadeada a fase crônica, que predispõe o hospedeiro a uma série de doenças inflamatórias crônicas, especialmente as doenças autoimunes (Figura1) (CHEN *et al.*, 2017; NYATI *et al.*, 2017; KATZ; ZSIROS; KISS, 2019).

Figura 1 - Inflamação aguda *versus* crônica.

Fonte: Adaptado de Anderton; Wicks; Silke (2020).

O fator de transcrição NF- κ B regula vários aspectos das funções imunes inatas e adaptativas, atuando como um mediador central das respostas inflamatórias. O NF- κ B induz a expressão de vários genes pró-inflamatórios, incluindo aqueles que codificam citocinas e quimiocinas. Além disso, o NF- κ B desempenha um papel crítico na regulação da sobrevivência, ativação e diferenciação de células imunes inatas e células T inflamatórias. Os membros canônicos do NF- κ B (RelA e c-Rel) têm um papel central na mediação da sinalização de receptor de célula T (TCR) e na ativação de células T virgens. O NF- κ B promove a diferenciação de células Th1 regulando a sinalização de TCR, bem como funcionando em células imunes inatas para mediar a indução de citocinas, como IL-12, que promovem a diferenciação Th1. As células Th1 são caracterizadas pela secreção de IFN- γ , uma citocina que promove a imunidade celular e participa de processos inflamatórios. O NF- κ B também promove a diferenciação de células Th17, caracterizadas pela secreção de IL-17, uma citocina inflamatória que recruta monócitos e neutrófilos para o local da inflamação em resposta à invasão de patógenos ou auto antígenos (GAGLIANI *et al.*, 2015; HUSSMAN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; NYATI *et al.*, 2017; AMATYA; GARG; GAFFEN, 2017; CRONIN *et al.*, 2018; MILOVANOVIC, J. *et al.*; 2020).

A função pró-inflamatória do NF- κ B também tem sido estudada em macrófagos, uma família de células imunes inatas que residem em diferentes tecidos e funcionam na

linha de frente de uma resposta imune contra infecções. Sob diferentes condições fisiopatológicas, os macrófagos ativados são capazes de se diferenciar em estados fenotipicamente diferentes, incluindo os macrófagos classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2). Os macrófagos M1 são caracterizados pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas, envolvidas em diversos processos inflamatórios. Os macrófagos M1 também induzem a diferenciação de células T inflamatórias, incluindo células Th1 e Th17, que por sua vez mediam a inflamação (WANG; LIANG; ZEN, 2014; WATANABE *et al.*, 2019; RUSSELL; HUANG; VANDERVEN, 2019; CUTOLO *et al.*, 2022).

No contexto da imunidade adaptativa representado pelas por células T e B, a ativação de células T virgens é iniciada após o envolvimento do receptor de célula T (TCR) por um antígeno específico apresentado em células apresentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas. Há muito se reconhece que as respostas inflamatórias mediadas por células T desempenham um papel essencial no desenvolvimento de doenças autoimunes, incluindo respostas de células Th1, Th2 e Th17. Além das células T, muitas outras células imunes também foram associadas no desenvolvimento de doenças autoimunes. As células B são mais conhecidas por sua capacidade de produzir anticorpos, que muitas vezes desempenham um papel crucial no desenvolvimento de doenças autoimunes (GAUBLomme *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2018; KAMALI *et al.*, 2019; MEIZLISH *et al.*, 2021; FAN *et al.*, 2022)

O uso de modelos murinos experimentais de doenças inflamatórias são importantes para a avaliação do potencial imunomodulador de novas substâncias com potencial terapêutico. Dentro deste contexto, a indução de edema em patas de camundongos pela carragenina, por exemplo, é um modelo experimental amplamente utilizado para testar a atividade anti-inflamatória de novas substâncias (MANSOURI *et al.*, 2015; HUDAYA; HARDIAN, 2019), onde a inflamação aguda é associada com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , contribuindo para a formação de edema e infiltração de neutrófilos (ANNAMALAI; THANGAM, 2016; KANG. *et al.*, 2019; UCIECHOWSKI; DEMPKE; 2020).

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado derivado de algas marinhas pertencentes à família das *Rhodophyceae*. Ela é amplamente utilizada como estímulo inflamatório em estudos pré-clínicos pela sua capacidade de estimular a liberação de mediadores inflamatórios e sinais da inflamação como o edema imediatamente após a sua injeção subcutânea (ANNAMALAI; THANGAM, 2016; LOPES *et al.*, 2020).

Patriota e colaboradores (2022) apresentaram em seus estudos a importância do modelo de edema de pata em camundongos induzido pela carragenina para avaliar a atividade anti-inflamatória da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL), que foi capaz de reduzir a infiltração de neutrófilos e as citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-17 e TNF- α).

Em outro estudo com o modelo de edema de pata induzido por carragenina realizado por Park e colaboradores (2016), mostraram que a espessura da pata e os níveis de expressão de interleucinas IL-1 β e IL-6 em homogenatos de pata foram significativamente diminuídos no grupo tratados com óleos essenciais extraídos de *Chamaecyparis obtusa* (EOCO), em comparação com o grupo controle.

Portanto, os estudos presentes na literatura reforçam a relevância do modelo experimental de edema de pata utilizando a carragenina como agente indutor da inflamação aguda, para triagem de substâncias com potencial anti-inflamatório.

2.2 TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

As doenças inflamatórias são comumente tratadas com fármacos desenvolvidos para amenizar os sinais e sintomas de uma resposta inflamatória por meio da inibição de enzimas, bloqueio de receptores ou antagonismo de ligantes específicos. Neste contexto, as principais classes de fármacos utilizados no tratamento das doenças inflamatórias, incluem os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e os anti-inflamatórios esteroides (AIES), também denominados de glicocorticóides (ou corticosteróides) (PERRETTI *et al.*, 2015; FULLERTON; GILROY, 2016; FILEP, 2022).

Os AINEs possuem ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica, portanto, são eficazes no controle do edema, febre e dor (GUNAYDIN; BILGE, 2018). Em geral, os AINEs podem ser divididos em duas grandes categorias: AINEs tradicionais não seletivos e inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2) (MEEK; VAN DE LAAR; VONKEMAN, 2010). Os AINEs tradicionais não seletivos podem ser classificados em diferentes subtipos: derivados do ácido salicílico: ácido acetilsalicílico (aspirina), diflunisal e sulfassalazina; derivados de para-aminofenol: acetaminofeno; fenamatos: ácido mefenâmico, meclufenamato, ácido flufenâmico; derivados do ácido propiônico: ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina; e derivados do ácido enólico (oxicam): piroxicam, tenoxicam. Os inibidores seletivos de COX-2 podem ser divididos em duas categorias: inibidores seletivos de COX-2 e inibidores altamente

seletivos de COX-2. Os inibidores seletivos de COX-2 incluem meloxicam, salicilato e nimesulida. Essas drogas inibem mais seletivamente a COX-2, em comparação com sua ação na COX-1. Os inibidores altamente seletivos de COX-2 caracterizados por substituir o cis-estilbeno por um dos anéis fenil pendentos por diferentes substitutos, denominados diari-heterociclos, incluindo celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumiracoxib, parecoxib e etoricoxib (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020).

O principal mecanismo dos AINEs está baseado na inibição das isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX), especialmente, COX-1, COX-2 e COX-3. A ciclooxigenase é necessária para converter o ácido araquidônico em tromboxanos, prostaglandinas e prostaciclina. A COX-1 é constitutivamente expressa em diversos tecidos, como as plaquetas, as células endoteliais e gastrointestinais. A COX-2 é induzida no processo inflamatório pelo estímulo de citocinas e fatores de crescimento e contribui significativamente para desenvolvimento dos sinais clínicos característicos. A COX-3, descrita mais recentemente, parece predominar em respostas do sistema nervoso central. Em alguns tecidos, a COX-2, é constitutiva, ou seja, também, exerce atividades fisiológicas, principalmente, sobre a fisiologia cardíaca. Portanto, a inibição completa de COX-1 e COX-2 inevitavelmente resulta em efeitos colaterais graves (CHAIAMNUAY; ALLISON; CURTIS, 2006; HARIRFOROOSH; ASGHAR; JAMALI, 2014; MORIN; FARDET, 2015; FULLERTON; GILROY, 2016; SRIUTTHA; SIRICHANCHUEN; PERMSUWAN, 2018).

Os AIEs são fármacos que mimetizam os efeitos do hormônio cortisol. Constituem uma classe de fármacos com diversidade estrutural, mas semelhanças nas propriedades farmacológicas e terapêuticas (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016). A prednisona/prednisolona, metilprednisolona e os fluorados, como dexametasona e betametasona, que são os AIEs mais utilizados. Atuam modulando a transcrição de genes inflamatórios. Neste contexto, a ligação dos glicocorticóides ao seu receptor específico resulta na inibição da via de sinalização celular como AP-1 e NF- κ B, e conseqüentemente regula a expressão de citocinas e quimiocinas. Embora versáteis e eficazes, eles demonstram benefício terapêutico decrescente ao longo do tempo, bem como toxicidade substancial em relação aos ossos, sistemas cardiovasculares e função metabólica (MCDONOUGH; CURTIS; SAAG, 2008; TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019).

Os medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs) são uma classe de medicamentos indicados para o tratamento de várias artrites inflamatórias e outras

doenças inflamatórias autoimunes (LAEV; SALAKHUTDINOV, 2015; LI; ZHENG; CHEN, 2017). Os DMARDs são agentes imunossupressores e imunomoduladores, classificados como DMARDs convencionais ou DMARDs biológicos. Os DMARDs convencionais comumente usados incluem metotrexato, leflunomida, hidroxicloroquina e sulfassalazina. O Metotrexato, leflunomida e sulfassalazina são semelhantes em seu perfil de efeitos adversos, apresentando desconforto gastrointestinal (náuseas, dor abdominal, diarreia), erupção cutânea, supressão da medula óssea, hepatotoxicidade e maior incidência de infecções comuns. Os DMARDs biológicos existem cinco anti-TNFs: infliximab, um monoclonal anti-humano IgG quimérico (Remicade®); etanercept, uma proteína de fusão dimérica TNFR2, com um IgG1 Fc (Enbrel®); adalimumab, um anticorpo monoclonal (mAb) totalmente humano (Humira®); golimumab, um mAb totalmente humano (Simponi®) e certolizumab, um fragmento Fab PEGuilado (Cimzia®) que melhoraram significativamente o resultado do tratamento de doenças inflamatórias autoimunes (MEIER et al., 2013 ; MONACO *et al.*, 2015). Os DMARDs biológicos são altamente específicos e têm como alvo uma via específica do sistema imunológico. No entanto, uma proporção considerável de pacientes não responde ao tratamento anti-TNF (RODA *et al.*, 2016). Além disso, os biológicos anti-TNF são caros e estão associados a alguns efeitos adversos, tendo como efeito adverso mais preocupante de todos os DMARDs biológicos o risco aumentado de infecções comuns e graves, incluindo infecções bacterianas, fúngicas e virais (LIMA *et al.*, 2017; BRENNAN *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2020; SERHAN *et al.*, 2020; FILEP, 2022). Este cenário revela a necessidade da busca por novos compostos para o tratamento de doenças inflamatórias.

2.3 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória crônica, caracterizada por desmielinização, glioses e degeneração axonal no sistema nervoso central (SNC) (REICH; LUCCHINETTI; CALABRESI, 2018). A EM é considerada de origem autoimune, sendo mediada, principalmente, por linfócitos T auto-reativos que respondem a auto-antígenos do SNC. Histopatologicamente, a EM é marcada por regiões multifocais de desmielinização, perda axonal, morte de oligodendrócitos e cicatrizes astrogliais que resultam em déficit da função neurológica (LASSMANN, 2018; REDFERN, 2021).

A etiologia da EM não é bem compreendida, mas sabe-se que a doença afeta indivíduos que apresentam predisposição genética e que são expostos a diferentes fatores

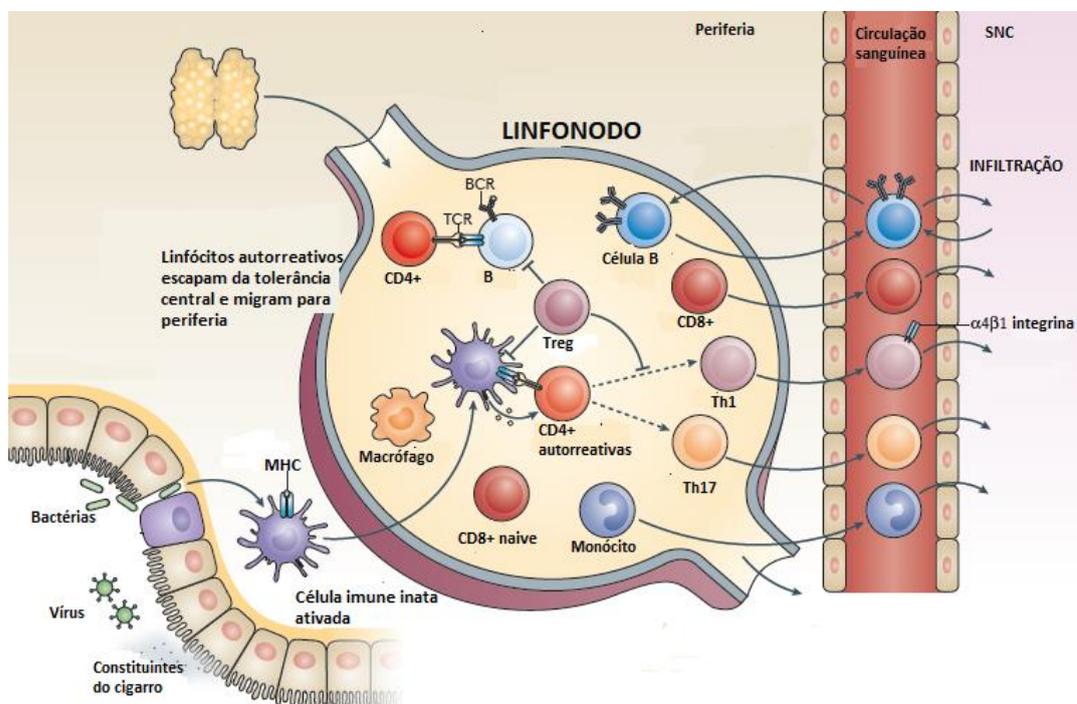
de risco ambientais. Em relação aos fatores de risco ambientais, podemos incluir o tabagismo, deficiência de vitamina D, obesidade e contato prévio com o vírus Epstein-Barr (CORREALE; FAREZ, 2015; BECKER *et al.*, 2016; ASCHERIO; MUNGER, 2016; NOVO; BATISTA, 2017; FERRE *et al.*, 2018; SIMPSON *et al.*, 2019; JAKIMOVSKI *et al.* 2019; WAUBANT *et al.*, 2019; SOLLID, 2022). Acredita-se também que o componente genético da etiologia da EM resulte da ação de variantes alélicas comuns em muitos genes e da contribuição emergente de variantes raras e rede complexa de interações moleculares e funcionais. Recentemente, um progresso considerável foi feito para compreensão da base genética para a suscetibilidade à EM. Assim, até o momento, usando telas de associação ampla do genoma (GWAS), que incorporam grandes matrizes de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) espalhados por todo o genoma, mais de 200 variantes de risco comuns localizadas em diversas regiões genômicas foram identificadas como associado a EM (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; ANDLAUER *et al.*, 2016; DARGAHI *et al.* 2017; NOURBAKHS; MOWRY, 2019). Alguns loci podem estar envolvidos nos eventos patogênicos iniciais, enquanto outros podem influenciar o desenvolvimento e progressão da doença. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) foi o primeiro locus de suscetibilidade da EM a ser identificado, e estudos anteriores descobriram que ele apresenta múltiplas variantes de suscetibilidade independentes (MOUTSIANAS *et al.*, 2015). O gene *HLA-DRB1* desempenha um papel fundamental na construção de uma proteína vital para o sistema imunológico, o complexo de antígeno leucocitário humano (HLA). O fator genético com a ligação mais forte com a EM é o Haplotipo *HLA-DRB1*15:01*(CANTO; OKSENBERG, 2018; WAUBANT *et al.*, 2019).

Dados recentes mostraram que a prevalência de EM está aumentando em todo o mundo, chegando a 2,8 milhões em 2020, com uma prevalência global de 35,9 por 100.000 pessoas. Em relação à prevalência de EM por região do mundo, o último relatório da Organização Mundial da Saúde de 2020 mostrou um aumento desde 2013 de 87% nas Américas, 59% na África, 58% no Sudeste Asiático, 38% no Mediterrâneo Oriental e 32% no tanto no Pacífico ocidental quanto na Europa. Conforme observado com a prevalência de EM, a variação regional na incidência (por 100.000 pessoas por ano) segue o mesmo padrão, sugerindo que a cada 5 minutos uma pessoa é diagnosticada com EM em algum lugar do mundo. A Europa continua sendo a região com maior incidência, chegando a 6,8 por 100.000 pessoas, enquanto as Américas registram 4,8 e Sudeste Asiático e África apresentaram taxas de 0,4%. A doença geralmente ocorre em indivíduos jovens e é mais comum no sexo feminino. Os relatórios globais indicam que a EM é três vezes mais

frequente mulheres, e em alguns países a proporção é de quatro mulheres para um homem. Destaca-se ainda muitas barreiras e desigualdades enfrentadas pelas pessoas com EM, como o acesso ao diagnóstico, o tratamento e os cuidados necessários (ASCHERIO; MUNGER, 2016; WALTON *et al.*, 2020; COETZEE; THOMPSON, 2020).

A imunopatogênese da EM envolve ativação de linfócitos T e B que atuam contra antígenos do SNC, levando à perda axonal progressiva, atrofia cerebral e deficiência neurológica e cognitiva (BIERHANSL *et al.*, 2022). Uma falha na resposta do sistema imune contra autoantígenos é gerada pela quebra dos mecanismos de tolerância central no timo para células T e na medula óssea para células B. No contexto da EM, estas células autorreativas que escapam da tolerância central, podem ser ativadas em órgãos linfoides periféricos por autoantígenos, os quais apresentam mimetismo molecular contra algumas proteínas do SNC, tais como os da mielina (DENDROU *et al.*, 2015). Uma vez ativada, células T CD4+, então se diferenciam em células T auxiliares pró-inflamatórias (Th1 e Th17) que secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- γ e IL-17. Durante o processo de ativação, tanto a célula T quanto a APC produzem citocinas que modulam a resposta imune. As citocinas que direcionam as respostas Th1 incluem IL-12, IFN- γ e IL-18, enquanto Th17 são direcionadas TGF- β , IL-1 β , IL-6 e IL-23. Sabe-se ainda que, os linfócitos T autorreativos ativados têm uma capacidade aumentada para atravessar a BHE devido à sua expressão elevada de mediadores, como receptores de quimiocinas, moléculas de adesão, integrinas e citocinas (Figura 2) (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; MILOVANOVIC *et al.*, 2020).

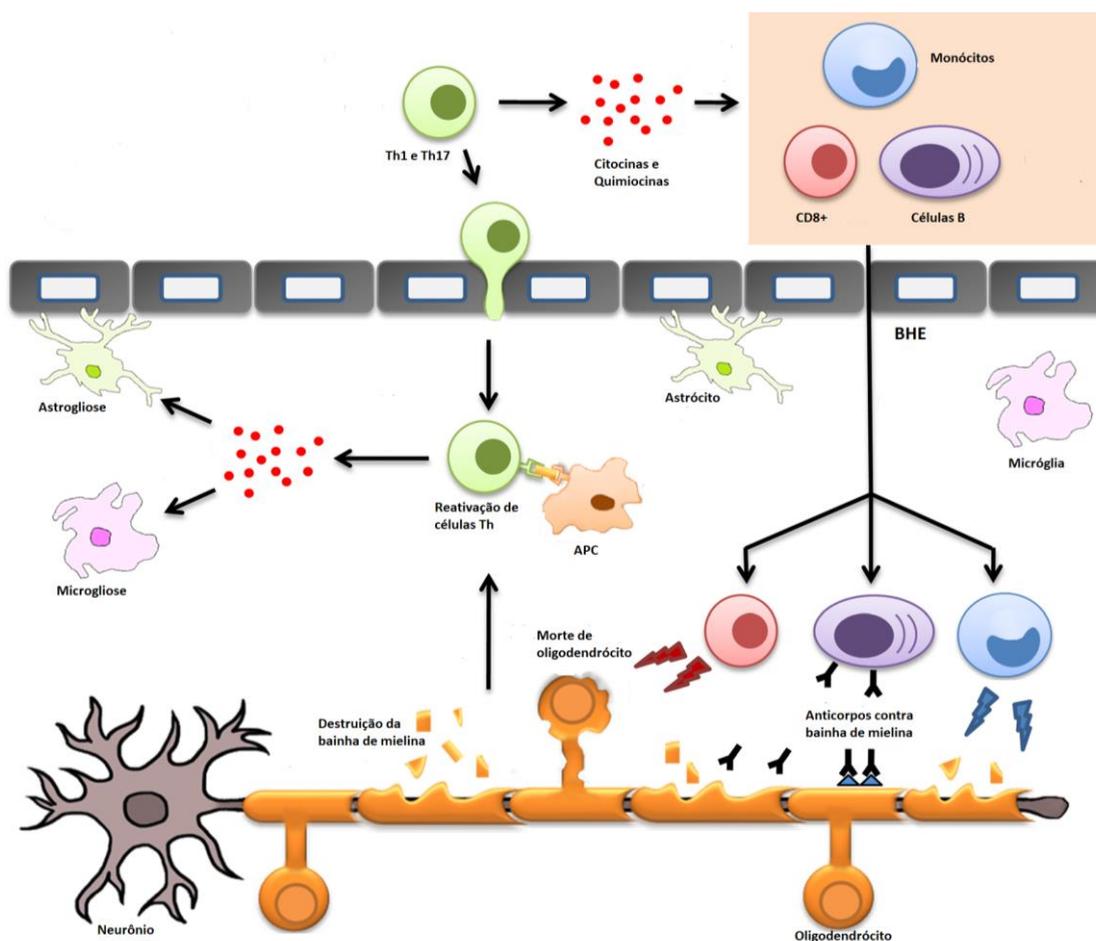
Figura 2 – Desregulação do sistema imunológico fora do SNC na EM.



Fonte: Adaptado de Dendrou; Fugger; Friese (2015).

As células Th1 e Th17 que entram no SNC são reativadas e expandidas pelas citocinas IL-1 β , IL-12, IL-6 e IL-23, produzidas pelas micróglias residentes e pelos monócitos infiltrantes. A degradação da bainha de mielina libera fragmentos que, por sua vez, são apresentados por APCs residentes no SNC e reativam células T CD4+ resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Sabe-se ainda que INF- γ é responsável por recrutar células CD8+, linfócitos B e monócitos, que deixam os linfonodos, atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e entram no SNC. As células CD8+ atacam os oligodendrócitos que sintetizam a mielina e exacerbam o dano neuronal. A ativação dos linfócitos B por coestimulação dos linfócitos T promove, por fim, a produção de auto anticorpos que danificam ainda mais a bainha de mielina e o axônio. As micróglias por sua vez fagocitam a bainha de mielina e liberam citocinas pró-inflamatórias que aumentam a resposta inflamatória local. A progressão da EM é caracterizada então, por infiltrado de células T e B, astrogliose, microgliose que contribuem para a atrofia cerebral e deficiência neurológica (Figura 3) (ZRZAVY *et al.*, 2017; LASSMANN, 2018; REDFERN, 2021).

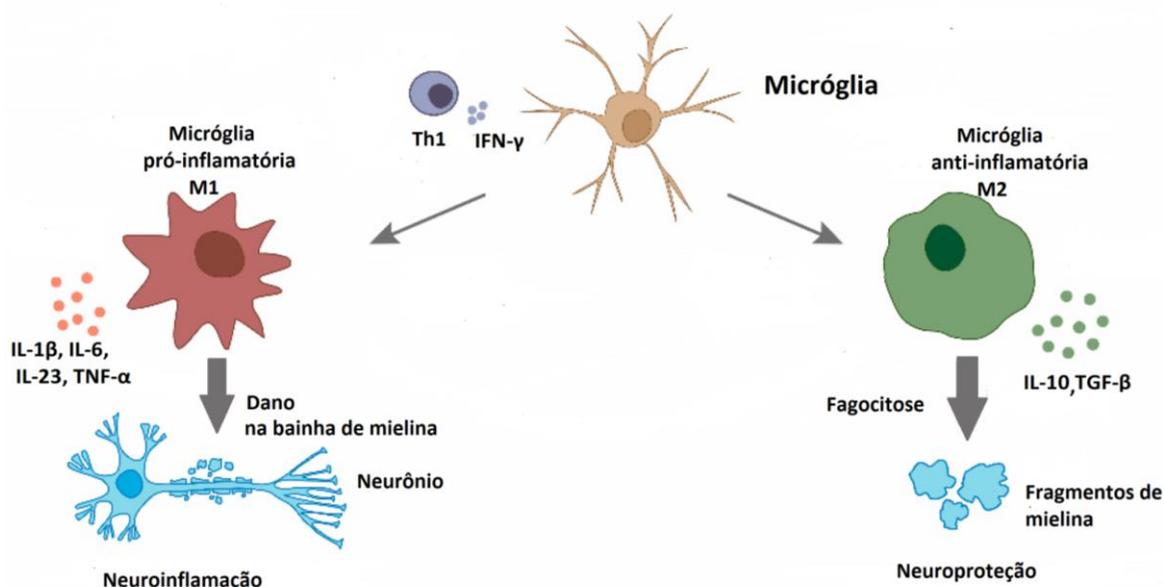
Figura 3 – Mecanismos imunopatológicos no desensolvimento da EM no SNC.



Fonte: Adaptado de Celarain; Tomas-Roig (2020).

O processo fisiopatológico de ativação microglial na EM é conhecido por induzir várias modificações fenotípicas. Dependendo da ativação podem desempenhar um papel na destruição do tecido pelo fenótipo M1 pró-inflamatório no início da EM ou de reparo tecidual pelo fenótipo M2 em remissão posterior. Em resposta ao IFN- γ liberado pelos linfócitos Th1, o fenótipo M1 aumenta a expressão do MHC II, torna-se célula apresentadora de antígeno e libera citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, IL-23 e o TNF- α (KYRAN *et al*, 2018). O fenótipo M1 é encontrado principalmente nas formas agressivas e progressivas da EM e tem sido associado histopatologicamente a dano axonal e atrofia cortical nestes pacientes (LASSMANN, 2017; ZETTERBERG, 2017; MASVEKAR *et al*, 2019). O fenótipo M2 também tem um fenótipo fagocitário, desencadeia respostas anti-inflamatórias através da liberação de IL-10 e do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (Figura 4) (FILIPPI; ROCCA, 2020; BAROR; LI, 2021).

Figura 4 - Polarização da microglia na EM.



Fonte: Adaptado de Geladaris; Häusler; Weber (2021).

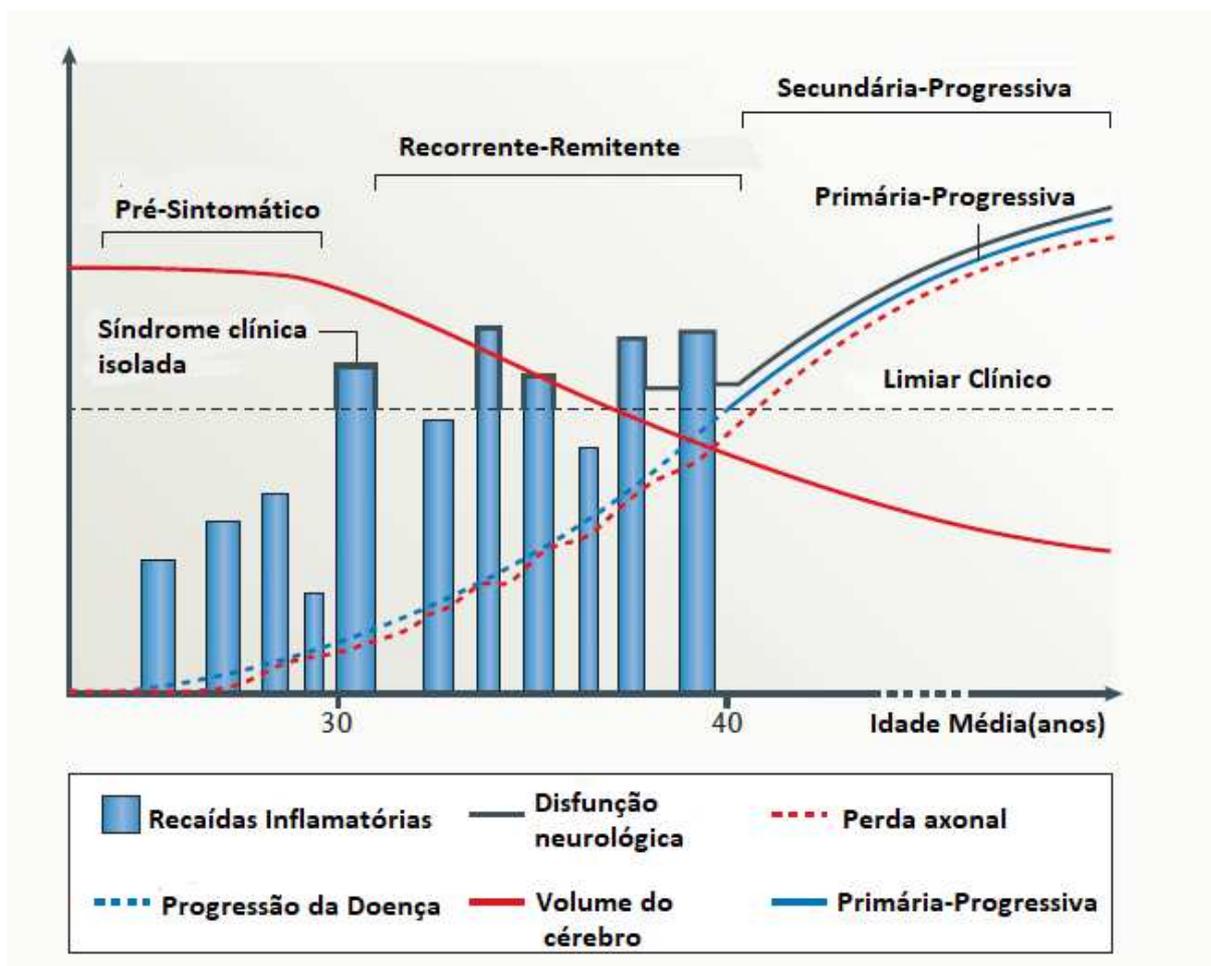
Atualmente, não há teste diagnóstico específico para EM. Embora exames de ressonância magnética (RM) do cérebro e da medula espinhal e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) possam ajudar, o diagnóstico ainda é baseado em critérios clínicos (ARRAMBIDE; TINTORE; MONTALBAN, 2019; SOLOMON *et al.*, 2019; SALAZAR *et al.*, 2022). Isso deve-se ao fato de a doença ser heterogênea quanto às manifestações clínicas, curso e progressão da incapacidade. Na maioria dos casos, após uma fase inicial caracterizada por episódios reversíveis de disfunção neurológica, a incapacidade clínica e o comprometimento cognitivo tornam-se irreversíveis. O diagnóstico de EM requer uma exclusão cuidadosa de diagnósticos alternativos e a demonstração de um processo patológico de disseminação no espaço e no tempo (THOMPSON *et al.*, 2018b).

O diagnóstico da EM pode ser realizado usando os critérios de McDonald. O primeiro conjunto de critérios foi publicado em 2001 por uma equipe liderada pelo professor Ian McDonald (MCDONALD *et al.*, 2001). Eles foram amplamente revisados várias vezes, mais recentemente em 2017 (THOMPSON *et al.*, 2018b). As revisões mais recentes não alteraram o diagnóstico de EM, mas podem permitir que um médico dê um diagnóstico de EM a alguém no início do curso da doença. Isso permite que o paciente tenha acesso ao tratamento certo mais cedo. O principal requisito para o diagnóstico de EM é a evidência de danos ao SNC que se disseminam no tempo e no espaço. Isso significa mostrar que o dano ocorreu em datas diferentes (Disseminação no tempo ou DIT) e em

diferentes partes (Disseminação no espaço ou DIS), distinguindo assim, a EM de outras condições neurológicas. Os critérios de McDonald usam evidências de ressonância magnética (RM) e sugerem que seja feita uma RM para todos aqueles com possível diagnóstico de EM. As lesões podem ser encontradas mesmo em alguém com poucos ou nenhum sintoma clínico, o que seria evidência de DIS. A presença de bandas oligoclonais no líquido também é um bom marcador para EM. Ela mostra que houve atividade da doença no passado e, portanto, pode ser usado como evidência de DIT (THOMPSON *et al.*, 2018b; HARTUNG *et al.*, 2019; ARRAMBIDE; TINTORE; MONTALBAN, 2019).

Atualmente temos quatro cursos básicos da EM que também podem ser chamados de tipos ou fenótipos, foram definidos pelo *International Advisory Committee on Clinical Trials of MS* em 2013: Síndrome Clinicamente Isolada (CIS) resultando da inflamação e desmielinização no SNC, representa o primeiro episódio de sintomas neurológicos com duração mínima de 24 horas; Recorrente-Remitente (RR) caracterizada por episódios de disfunção neurológica seguidos de remissão completa ou parcial; Secundária-Progressiva (SP) segue o curso inicial do tipo RR, e caracterizada por um agravamento progressivo da incapacidade ao longo do tempo e Primária-Progressiva (PP) em que a piora progressiva ocorre desde o início da EM sem recidivas. As formas definidas como RR, SP e PP, cada uma podem apresentar quatro variantes de acordo com a atividade inflamatória ou progressão da incapacidade: não progressiva/não ativa, não progressiva/ativa, progressiva/não ativa, progressiva/ativa. Embora não seja considerada um curso de EM, a Síndrome Radiologicamente Isolada (RIS) tem sido usado para classificar aqueles com anormalidades na RM do cérebro e/ou medula espinhal consistentes com lesões de EM que não explicadas por outro diagnóstico e que também não apresentam sintomas neurológicos passados ou atuais ou anormalidades encontradas no exame neurológico (LUBLIN *et al.*, 2014). Muitas vezes, esses indivíduos fizeram uma ressonância magnética por causa de outros sintomas, como dor de cabeça, e foram encontradas lesões que parecem semelhantes às observadas na EM. Em um estudo Lebrun-Frenay e colaboradores (2020) descobriram que um pouco mais da metade das pessoas com RIS desenvolvem EM dentro de dez anos.

Figura 5 - Cursos clínicos da EM.



Fonte: Adaptado de Dendrou; Fugger; Friese (2015).

Embora ainda não exista tratamento que cure a EM, as pesquisas levaram a grandes avanços nas terapias e nas estratégias de tratamento. Essas opções de tratamento variam de terapias projetadas para modificar ou retardar o curso da doença, medicamentos usados para controlar recaídas da doença e outras abordagens que ajudam com sintomas específicos da EM (Figura 6). Os tratamentos para EM que podem alterar o curso da doença são chamados de terapias modificadoras da doença (DMTs) (FILIPPI; ROCCA, 2020).

Na Tabela 1 estão resumidos os tratamentos terapêuticos para EM (HAUSER; CREE, 2020; YANG *et al.*, 2022).

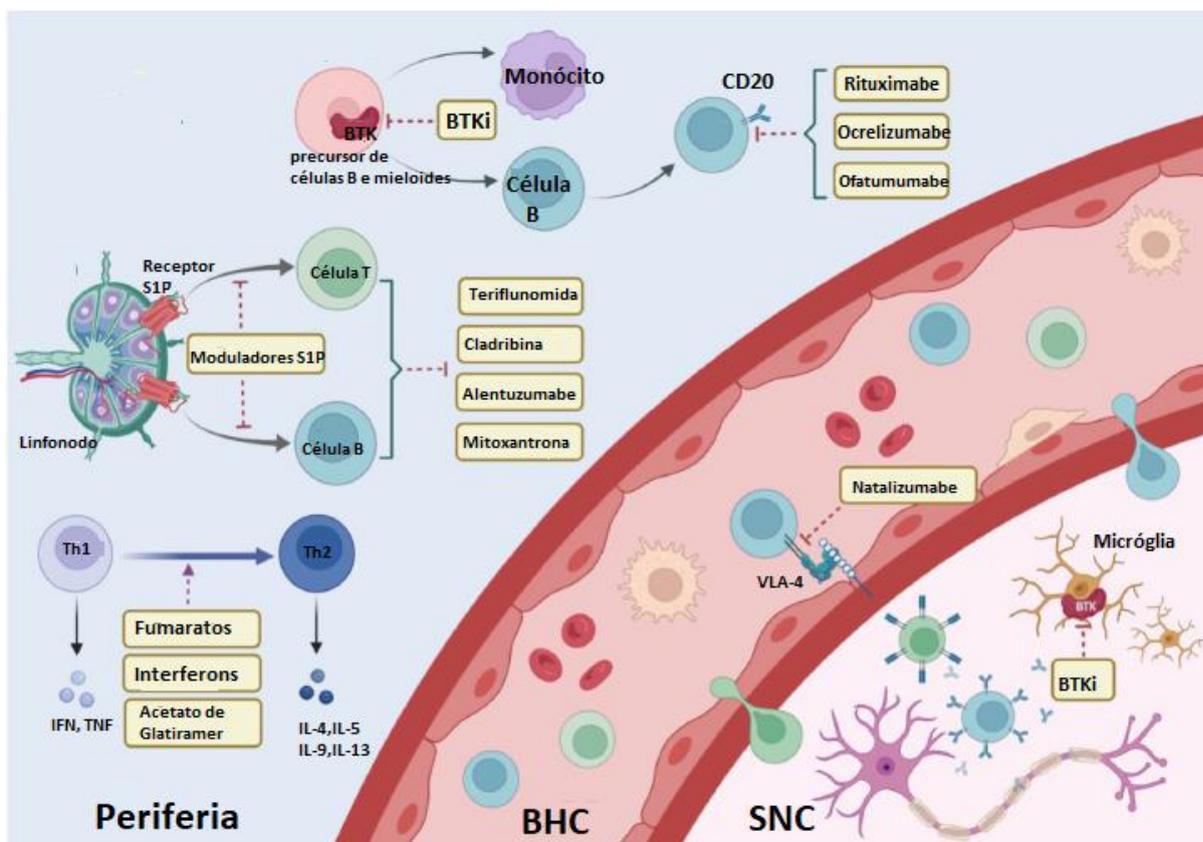
Tabela 1 - Tratamentos terapêuticos para EM

Fármaco	Mecanismo de ação	Indicação	Via e frequência de administração	Aprovação	Efeitos adversos
Medicamentos de alta eficiência (infusão intravenosa e injetáveis subcutâneos)					
Ocrelizumabe	Anticorpo monoclonal Anti-CD20	CIS, RR, PP e SP ativa.	Infusão intravenosa, a cada 6 meses.	Aprovado pela FDA em 2017.	Reação relacionada à infusão, nasofaringite, infecção do trato respiratório superior, dor de cabeça e infecção do trato urinário.
Ofatumumabe	Anticorpo monoclonal Anti-CD20	CIS, RR e SP ativa.	Injeção subcutânea, a cada 4 meses.	Aprovado pela FDA em 2020.	Reação relacionada à injeção, nasofaringite, dor de cabeça, infecção do trato respiratório superior e infecção do trato urinário.
Natalizumabe	Inibidor de integrina $\alpha 4\beta 1$	CIS, RR e SP ativa.	Infusão intravenosa, a cada 4 meses.	Aprovado pela FDA em 2004.	Fadiga e reação alérgica.
Alentuzumabe	Anticorpo monoclonal Anti-CD52	RR e SP ativa.	Infusão intravenosa, uma vez ao dia.	Aprovado pela FDA em 2014.	Dor de cabeça, erupção cutânea, náusea e febre.
Mitoxantrona	Intercalador de DNA, inibe a divisão celular.	RR, PP e SP.	Infusão intravenosa, a cada mês ou 3 meses.	Aprovado pela FDA em 2000.	Cardiomiopatia relacionada à dose, leucemia promielocítica.
Injetáveis tradicionais					
IFN β-1a (Rebif)	Imunomodulador.	CIS, RR e SP ativa.	Injeção subcutânea, 3 vezes por semana.	Em 1993, a terapia com interferon foi o primeiro DMT aprovado pela FDA.	Inflamação no local da injeção, sintomas semelhantes aos da gripe, rinite e dor de cabeça.
IFN β-1a (Avonex)	Imunomodulador.	CIS, RR e SP ativa.	Injeção intramuscular, uma vez por semana.		Sintomas gripais, dores musculares, astenia, calafrios e febre.
PegIFN β-1a (Plegridy)	Imunomodulador.	CIS, RR e SP ativa.	Injeção subcutânea, a cada 2 semanas.		Eritema no local da injeção, doença semelhante à influenza, pirexia e dor de cabeça.
IFN β-1b (Betaseron)	Imunomodulador.	CIS, RR e SP ativa.	Injeção subcutânea, em dias alternados.		Linfopenia, sintomas semelhantes aos da gripe e reações no local da injeção.

Acetato de Glatiramer	Imunomodulador.	CIS, RR e SP ativa.	Injeção subcutânea, uma vez ao dia ou 3 vezes por semana	Aprovado pela FDA em 1997.	Reações no local da injeção.
Medicamentos orais					
Teriflunomida (Aubagio)	Inibidor de divisão celular	CIS, RR e SP ativa.	Via oral, uma vez ao dia.	Aprovado pela FDA em 2012	Nasofaringite, cefaleia e diarreia.
Fumarato de dimetila e Fumarato de diroximel	Imunomodulador	CIS, RR e SP ativa.	Via oral, duas vezes ao dia.	Aprovado pela primeira vez para EM em 2013.	Rubor, diarreia, náusea, dor abdominal superior, diminuição da contagem de linfócitos.
Fingolimode	Inibidor de esfingosina-1-fosfato	CIS, RR e SP ativa.	Via oral, uma vez ao dia.	O modulador do receptor S1P, fingolimode, foi aprovado pela FDA em 2010.	Bradycardia, bloqueio da condução atrioventricular, edema macular, níveis elevados de enzimas hepáticas e hipertensão leve.
Siponimode	Modulador do receptor de esfingosina-1-fosfato	CIS, RR e SP ativa.	Via oral, uma vez ao dia.		Dor de cabeça, nasofaringite, infecção do trato urinário.
Ozanimode	Modulador do receptor de esfingosina-1-fosfato	CIS, RR e SP ativa.	Via oral, uma vez ao dia.		Cefaleia e elevação das aminotransferas hepáticas.
Cladribina	Efeito citotóxico nas células B e T.	RR e SP ativa.	Via oral, 4- 5 dias.	Aprovado pela FDA em 2019	Cefaleia, linfocitopenia, nasofaringite, infecção do trato respiratório superior e náusea
Medicamentos de via oral em investigação					
Evobrutin	Inibidor de tirosina quinase de Bruton (BTKi)	RR	Via oral, uma vez ao dia.	Pesquisa de fase 2 completa.	Dor de cabeça
Tolebrutinibe	Inibidor de tirosina quinase de Bruton (BTKi)	RR, SP e PP.	Via oral, uma vez ao dia.	Pesquisa de fase 2 completa.	Dor de cabeça e nasofaringite.
Orelabrutinib	Inibidor de tirosina quinase de Bruton (BTKi)	RR	Via oral.	Pesquisa de fase 2 em andamento.	

Fonte: Adaptado de Hauser; Cree, (2020) e Yang *et al.*, (2022).

Figura 6 - Mecanismos de ação das terapias para EM.



Fonte: adaptado de Yang *et al.* (2022).

Mesmo com o uso adequado destas terapias apresentadas acima, nem todos os pacientes são responsivos aos mesmos, dado a heterogeneidade da doença. E embora avanços notáveis tenham ocorrido na terapia para EM, a taxa de incapacidade progressiva e mortalidade precoce ainda é preocupante (GHOLAMZAD *et al.*, 2018; HAUSER; CREE, 2020). Ademais, os efeitos adversos e o alto custo limitam a utilização destes fármacos (MOIOLA; ROMMER; ZETTL, 2020; HARTUNG, 2021). Em um estudo realizado no Brasil com pacientes com EM, foi determinada uma estimativa de custo médio anual total foi de R\$ 33.872,00 por paciente (KOBELT *et al.*, 2019).

Dessa forma, torna-se importante novas pesquisas que busquem alternativas terapêuticas eficazes, tanto clinicamente como economicamente e que forneçam além da eficácia farmacológica menores efeitos adversos para o paciente.

2.4 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

Modelos animais recapitulando as manifestações clínicas e histopatológicas

surgiram como alternativa para o estudo de doenças humanas inflamatórias do SNC, nas quais temos limitações de estudos em humanos, devido à dificuldade do acesso ao tecido afetado e à rara realização de autopsias. Logo, muito do que se sabe hoje sobre a resposta imunológica e tratamentos na EM é graças aos estudos desenvolvidos nesses modelos (MCGINLEY *et al.*, 2018; MILOVANOVIC *et al.*, 2020; BIRMPILI *et al.*, 2022).

Na avaliação de um processo inflamatório e doenças autoimunes do SNC, destaca-se a encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo animal que apresenta muitos aspectos clínicos, morfológicos e histológicos em comum com a EM. Este modelo de doença autoimune é induzido por meio da imunização ativa ou da transferência adotiva de células T CD4⁺ reativas contra a mielina. De acordo com o tipo de animal utilizado e o material escolhido para indução há diferentes variações do modelo EAE (KIPP *et al.*, 2017; GLATIGNY; BETTELLI, 2018).

O modelo murino C57BL/6 tem sido bastante útil na indução de EAE crônica e severa, especialmente quando se aplica a glicoproteína mielínica de oligodendrócito (MOG) como indutora da doença. Os linfócitos de camundongos C57BL/6 expostos a antígenos da mielina expressam maior número de receptores de células T para MOG e maior título de anticorpos anti-MOG, resultando em uma forma mais grave da EAE (AHARONI *et al.*, 2021; KIPP *et al.*, 2017; CONTARINI; GIUSTI; SKAPER, 2017).

O modelo de indução da EAE realizada com os camundongos da linhagem C57BL/6, pelo peptídeo MOG₃₅₋₅₅ se caracteriza por lesões inflamatórias e desmielinizantes em nervo óptico, cérebro e medula espinhal. Além disso, os infiltrados inflamatórios são perivascularares, constituídos principalmente por macrófagos e linfócitos T, podendo ocorrer ainda algum grau de resposta humoral com formação de títulos significativos de anticorpos anti-MOG (KIPP *et al.*, 2017; AHARONI *et al.*, 2021).

Para sua indução, os animais são imunizados com uma injeção subcutânea de uma emulsão composta por MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund (CFA) acompanhada de injeção intraperitoneal (i.p.) de toxina pertusis. Consequentemente, as células T, são ativadas na periferia e migram para o SNC através da barreira hematoencefálica (BHE). Após a entrada no SNC, as células T são reativadas resultando em processos inflamatórios subsequentes. A administração de toxina aumenta a permeabilidade na BHE e, assim, facilita a migração de linfócitos para o SNC, levando ao início mais precoce dos sintomas, bem como intensificando os sintomas clínicos de EAE (HASSELMANN *et al.*, 2017; AHARONI *et al.*, 2021; HUNTEMANN *et al.*, 2022;)

O modelo EAE além de ser induzido através da MOG, pode ser induzido pelos de

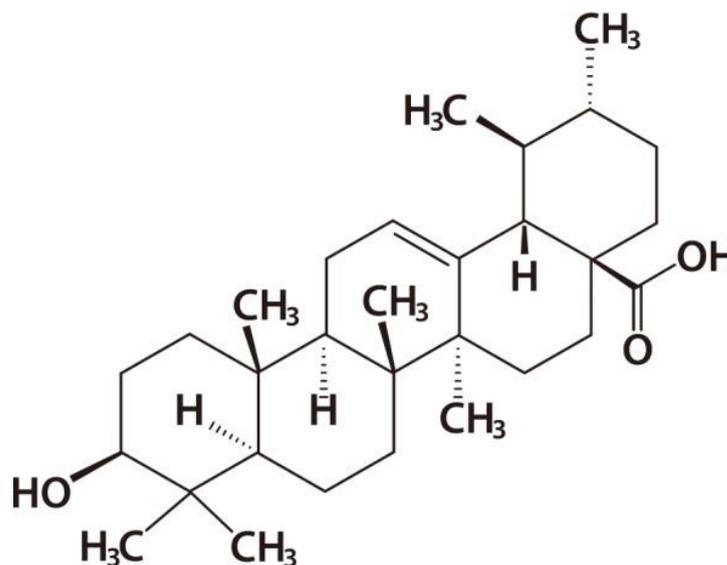
componentes da proteína básica de mielina (PBM) ou da Proteína Proteolipídica (PLP) que, depois de extraídos e purificados, são emulsificados e injetados nos animais susceptíveis. As formas clínicas da EAE podem variar de acordo com o protocolo de indução utilizado. A glicoproteína MOG é expressa no SNC e está localizada nos corpos celulares e constituintes da bainha de mielina dos oligodendrócitos. Em função desta localização a MOG tem sido objeto de estudos que apóiam a possibilidade de ela ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM (RONCHI *et al.*, 2016; GLATIGNY; BETTELLI, 2018).

2.5 ÁCIDO URSÓLICO (AU)

As plantas são popularmente utilizadas para o tratamento de diversas doenças e fonte constante de estudos na busca de novos compostos terapêuticos, tanto no objetivo de potencializar os efeitos de medicamentos já existentes, assim como na descoberta de novos compostos terapêuticos para doenças que não possuem tratamento efetivo (RAMÍREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017; PATRIDGE *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2021). Dentro deste contexto, estudos vêm sendo realizados para a obtenção de compostos bioativos que possam ser utilizados na prevenção e também no tratamento de diversas doenças (LI; ZHENG; CHEN, 2017; ZHANG *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2021).

Entre os diversos compostos extraídos de plantas é possível destacar o AU apresentado na Figura 7, um triterpeno pentacíclico encontrado em diversas plantas, incluindo maçã, manjeriço, cranberry, menta, alecrim, orégano e ameixa (KASHYAP; TULI; SHARMA, 2016; SEO *et al.*, 2018; GUDOITYTE *et al.*, 2021).

Figura 7 - Estrutura química do ácido ursólico.



Fonte: Seo *et al.* (2018).

O AU apresenta múltiplos alvos intracelulares e extracelulares destacando-se por sua atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, entre outras (KASHYAP; TULI; SHARMA, 2016; CARGNIN; GNOATTO, 2017; RAMOS-HRYB *et al.*, 2017; SEO *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2021; RENDA; GÖKKAYA; ŞÖHRETOĞLU, 2021; TRIPATHI; ALSHAHRANI, 2021).

Vários trabalhos têm sido realizados demonstrando o potencial anti-inflamatório do AU. Em estudo *in vitro*, utilizando com macrófagos murinos (J774A.1) estimulados com LPS o AU apresentou efeito anti-inflamatório ao reduzir os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF e aumentar a produção de IL-10 (GONZÁLEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2017). Wang e colaboradores (2020) demonstraram que o AU atenuou a produção de IL-1 β e IL-6 em condrócitos estimulados por TNF- α . Adicionalmente, no estudo realizado por Chun e colaboradores (2014) o AU inibiu a ativação de NF- κ B, interferindo na fosforilação da subunidade inibitória do I κ B- α , o que resultou na redução da expressão de quimiocinas e na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Em estudo *in vivo* Ahmad e colaboradores (2006) revelaram que o AU reduz a expressão da citocina Th1 (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α). Adicionalmente, Baek e colaboradores (2014) observaram que o AU reduziu significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) em um modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA).

Diversos estudos têm evidenciado o potencial terapêutico do AU em distúrbios

neuro-inflamatórios (RAMOS-HRYB *et al.*, 2017; RAI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2021; SALAU *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2023). Zhang e colaboradores (2014), demonstraram que o AU protege contra lesão cerebral precoce em modelo de hemorragia subaracnóidea experimental, suprimindo a via inflamatória mediada por TLR4/NF- κ B. Corroborando com esse estudo, Wang e colaboradores (2018), demonstraram o AU reduziu a produção de citocinas inflamatórias protegendo o cérebro da lesão de isquemia e reperfusão cerebral através da via de sinalização HMGB1 / TLR4 / NF- κ B. Em um estudo realizado por Sahu e colaboradores (2018) demonstraram que o AU diminuiu os níveis de marcadores pró-inflamatórios, incluindo IL-6 e TNF- α , na medula espinhal com lesão na fase aguda da inflamação. Adicionalmente, Yamamoto e colaboradores (2020), demonstraram que em modelo de desmielinização induzidos por cuprizona (CPZ), o tratamento com o AU reduziu a desmielinização e disfunção motora dos animais. Recentemente, Rong e colaboradores (2022) observaram que o tratamento com AU em camundongos com lesão medular foi capaz de inibir a resposta inflamatória e proteger a atividade neuronal. Xu e colaboradores (2011) demonstraram que o AU inibe de forma seletiva a função do ROR γ t, diminuindo significativamente a expressão de IL-17, em células Th17, e melhorando os sinais clínicos da EAE. Adicionalmente, Xu e colaboradores (2022) reforçaram que o AU inibiu a diferenciação de células Th17 por reprimir a via de sinalização STAT3/ROR γ t. Em um experimento utilizando o modelo EAE, Zhang e colaboradores (2020), observaram que o AU reduziu a gravidade da doença e melhorou a recuperação clínica no início, no pico e nas fases crônicas da EAE ao reduzir o número de células Th1 e Th17.

Portanto, considerando que o AU é capaz de modular a resposta inflamatória *in vitro* e ainda em modelos experimentais, inibindo a ativação de NF- κ B e a produção de IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α e IFN- β , bem como outros mediadores, torna-se relevante estudar possíveis efeitos imunomodulatórios dos derivados do ácido ursólico: 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1) e o 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2) sobre a resposta inflamatória em modelos animais de inflamação aguda e inflamação crônica.

3 HIPÓTESE

A atividade imunomoduladora demonstrada pelos derivados do ácido ursólico: 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1) e o 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2), contribuiriam para a redução da inflamação aguda em edema de pata de camundongos BALB/c induzidos por carragenina, com a redução dos mediadores inflamatórios. E ainda os mesmos derivados do AU, levariam à melhoria dos sinais clínicos e das alterações imunohistopatológicas do SNC em camundongos C57BL/6 induzidos com EAE.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulador dos derivados do ácido ursólico: 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1) e o 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2), nos modelos murinos de edema de pata e de encefalomielite autoimune experimental.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

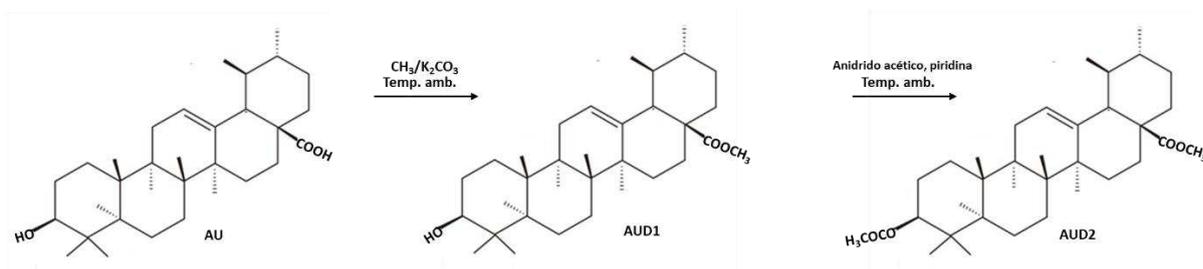
- Avaliar o edema de pata induzido por carragenina em camundongos BALB/c tratados com os derivados do ácido ursólico (AUD1 e AUD2);
- Avaliar os efeitos dos derivados do ácido ursólico (AUD1 e AUD2) na produção da citocina IL-6 em camundongos BALB/c induzido pela carragenina;
- Avaliar o efeito dos tratamentos com os derivados do ácido ursólico (AUD1 e AUD2) no escore clínico e na massa corporal dos animais com EAE;
- Avaliar a histopatologia do SNC dos animais com EAE, tratados com derivados do ácido ursólico (AUD1 e AUD2);
- Avaliar os efeitos dos tratamentos com os derivados do ácido ursólico (AUD1 e AUD2) na produção de citocinas IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6 e IFN- γ dos animais com EAE;
- Avaliar a expressão de FOXP3, IL-10, CD4, IL-17A, CD8, IFN- γ , CD25, MHC-II, CD80, CD11c, CD86 em células de linfonodos inguinais e cérebro dos animais com EAE, tratados com derivados do ácido ursólico (AUD1 e AUD2).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS DO ÁCIDO URSÓLICO

Para a realização dos ensaios propostos no presente trabalho, foram empregados dois derivados semissintéticos do ácido ursólico (AUD1 e AUD2), com modificações principalmente os carbonos nas posições C-3 e C-28, obtidos no Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca, Espanha pela Profa. Ydia Mariele Valadares da UFJF-campus Governador Valadares (Figura 8). O ácido ursólico para obtenção dos derivados semissintéticos foi isolado de *Jacaranda caroba* e *Remijia ferruginea*. A síntese destes dois derivados semissintéticos do ácido ursólico representados na Figura 8, foi previamente publicada por Scherrer *et al.* (2019).

Figura 8 - Derivados semissintéticos de ácido ursólico (AU): 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato (AUD1), 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.2 ANIMAIS PARA EXPERIMENTO DE EDEMA COM CARRAGENINA

Para a indução do edema de pata, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com quatro semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Minas Gerais. Eles foram mantidos no biotério de manutenção da Faculdade de Medicina da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (FAMMUC-UFVJM) - Teófilo Otoni/MG em estantes ventiladas e dieta ad libitum. Todos os procedimentos estavam de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFVJM – CEUA/Mucuri (Protocolo nº 03-2018R).

5.3 INDUÇÃO DE EDEMA DE PATA POR CARRAGENINA E TRATAMENTO COM AU E SEUS DERIVADOS AUD1 E AUD2

Os camundongos BALB/c fêmeas foram divididos em seis grupos (6 animais/grupo) (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização dos grupos de camundongos para modelo de edema de pata

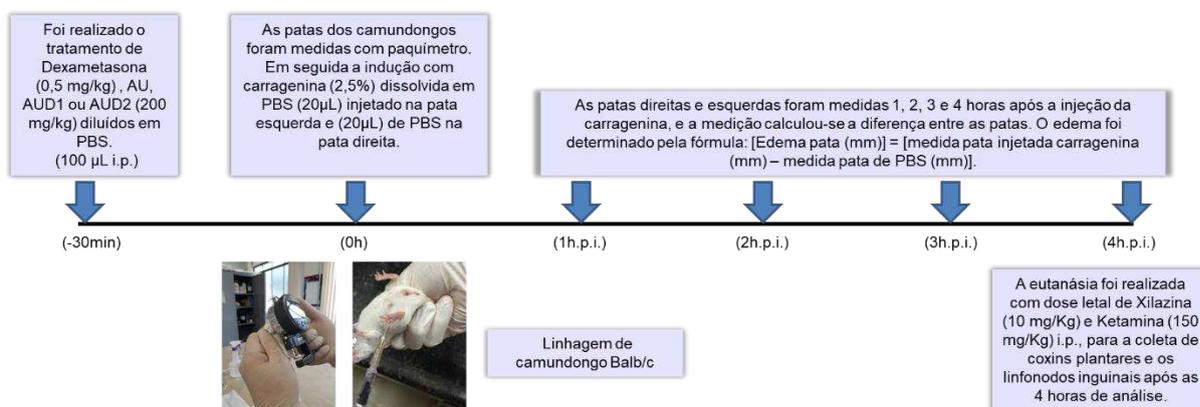
GRUPO* (6 animais/grupo)	Carragenina	TRATAMENTO
CN	Não induzido	Não recebeu tratamento.
CARRAGENINA	Induzido	Tratado com PBS.
DEXA	Induzido	Tratado com dexametasona com 0,5mg/kg de peso, i.p.
AUD1	Induzido	Tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1) com 200 mg/kg de peso, i.p.
AUD2	Induzido	Tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2) com 200 mg/kg de peso, i.p.
AU	Induzido	Tratado com o ácido ursólico (AU) com 200mg/kg de peso, i.p.

*Foram realizadas 3 repetições

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Trinta minutos antes da indução do edema nas patas dos camundongos BALB/c fêmeas os mesmos foram tratados com PBS, dexametasona (0,5 mg/kg) ou o AU e seus derivados AUD1 e AUD2 diluídos em PBS (200 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (100 µL). Animais tratados com dexametasona foram utilizados como controle positivo, pela conhecida atividade anti-inflamatória. Posteriormente, suas patas foram medidas com paquímetro (0h). A carragenina (2,5 %) foi dissolvida em PBS, e 20 µL injetado na pata esquerda, e 20 µL de PBS na pata direita de todo o grupo. As patas direitas e esquerdas foram medidas 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina, e a medição calculou-se a diferença entre as patas (Figura 9). O edema induzido nas patas dos camundongos pela carragenina foi determinado pela fórmula: [Edema pata (mm)] = [medida pata injetada carragenina (mm) – medida pata de PBS (mm)].

Figura 9 - Delineamento experimental do experimento de edema de pata induzidos por carragenina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.4 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA

A eutanásia foi realizada com dose letal de Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (150 mg/Kg) por via intraperitoneal, para a coleta de coxins plantares e os linfonodos inguinais após as 4 horas de análise. Após estarem completamente anestesiados, os animais foram perfundidos no ventrículo esquerdo com solução tampão fosfato (PBS) para a retirada dos linfonodos inguinais e coxins plantares para a quantificação de citocinas por ELISA. Os tecidos retirados foram rapidamente armazenados em freezer -80°C.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA

Os coxins plantares e os linfonodos inguinais removidos, pesados e homogeneizados (100mg/mL) em solução de extração contendo 0.4 M NaCl, 0.05% de tween 20 (Merck & Co., Inc., *Whitehouse Station*, USA), 0.5% de albumina soro bovino, 0.1M de fenilmetilsulfonil fluoride. Em seguida os homogeneizados foram centrifugados a 2000xg por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80 °C. As concentrações de IL-6 foram determinadas nos sobrenadantes dos linfonodos inguinais e dos coxins plantares pelo método ELISA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico conforme especificado no protocolo de

instrução (BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA), incubadas “over night”, em seguida lavadas com PBS-Tween quatro vezes e bloqueadas com PBS-Soro Fetal por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas novamente e, em seguida as amostras e os padrões de citocinas foram adicionados nos poços das placas. As placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação, as placas foram lavadas e o 2º anticorpo biotilado acrescentado. A placa foi incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente e mais quatro lavagens foram feitas e, após a colocação do conjugado enzimático estreptavidina-biotina, as placas foram incubadas por mais 1 hora. Transcorrido o tempo de 1 hora, a reação foi revelada pela adição do substrato e por fim bloqueada com ácido sulfúrico 2N e a leitura feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas IL-6 foram calculadas a partir da curva-padrão, obtida pela concentração do recombinante para IL-6 (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA).

5.6 ANIMAIS PARA EXPERIMENTO DE EAE

Para a indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE), foram utilizados 70 camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas, com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério do CBR-UFGM. Eles foram mantidos no biotério de manutenção da FAMMUC-UFVJM em estantes ventiladas e dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos foram de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório. Este Trabalho foi aprovado pela CEUA-Mucuri/UFVJM (Protocolo nº04-2019R).

5.7 INDUÇÃO DO MODELO DE EAE E TRATAMENTO COM AU E SEUS DERIVADOS

Os camundongos foram divididos em cinco grupos (14 animais/grupo) (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização dos grupos de camundongos para a indução da EAE.

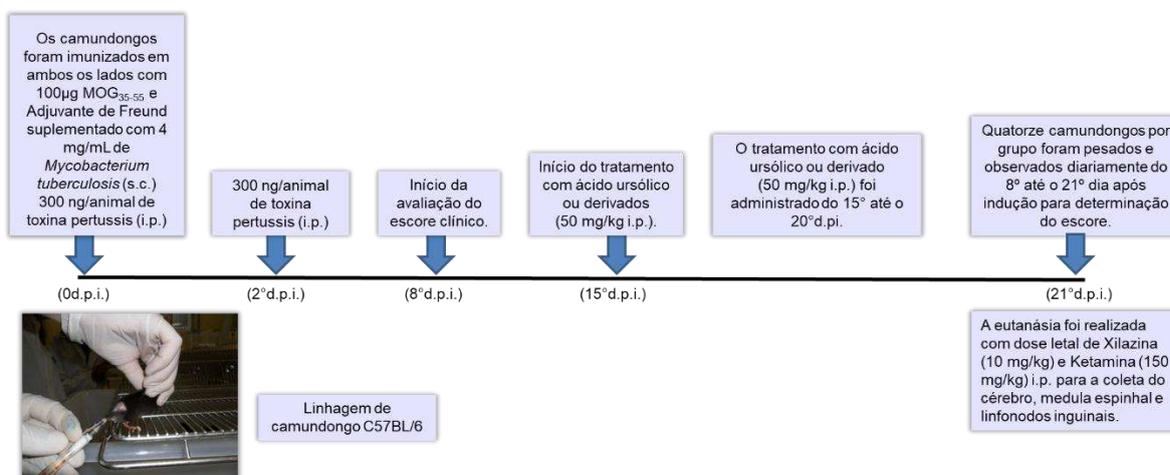
GRUPO* (14 animais/grupo)	EAE	TRATAMENTO
CN	Não induzido	Não recebeu tratamento.
EAE	Induzido	Não recebeu tratamento.
AU	Induzido	Tratado com ácido ursólico (AU) com 50 mg/Kg de peso, i.p.
AUD1	Induzido	Tratado com 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD1) com 50 mg/Kg de peso, i.p.
AUD2	Induzido	Tratado com 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila (AUD2) com 50 mg/Kg de peso, i.p.

*Foram realizadas 3 repetições

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Cada animal foi imunizado (dia zero) por via subcutânea (s.c.) em cada lado da região dorsal próxima à base da cauda com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (*Sigma Chemical Co, Saint Louis, USA*) emulsionado em Adjuvante Completo de Freund (*Sigma*) na proporção de 1:1 suplementado com 400 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (*Difco, Detroit, USA*). No dia da imunização (dia zero) e após 48 horas, cada animal recebeu i.p. 300 ng de toxina pertussis (*Sigma*) em PBS em cada aplicação. Os tratamentos com ácido ursólico e os seus derivados AUD1 e AUD2 foram realizados por via intraperitoneal na concentração de 50 mg/kg. A dose e a via de administração do AU, AUD1 e AUD2 foram baseadas em estudos *in vivo* anteriores que mostraram efeitos anti-inflamatórios do AU (*XU et al., 2011; ZHANG et al., 2014*). Todos os tratamentos foram realizados diariamente, por 6 dias, a partir do 15^o dia após a indução da EAE.

Figura 10 - Delineamento experimental do experimento do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.8 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE

Todos os animais por grupo foram avaliados em relação ao escore clínico e massa corporal. Em relação a massa corporal dos animais, os camundongos foram pesados diariamente desde o primeiro dia da indução (dia zero) até o dia da eutanásia (21º dia após imunização). A avaliação do escore clínico foi realizada do 8º até o 21º dpi, sendo que os animais foram clinicamente avaliados e classificados com relação à incapacidade neurológica através da escala apresentada na Tabela 4, adaptada por De Paula e colaboradores (2008). O escore final de cada animal corresponde ao somatório da pontuação obtida em todos os parâmetros avaliados em um mesmo dia.

Tabela 4 - Escala score clínico para avaliar a EAE.

Parte do animal	Sinais clínicos	Escore ^a
Cauda	Nenhum sinal clínico	0
	Perda do tônus muscular da cauda	1
	Paralisia	2
Membro-posterior	Nenhum sinal clínico	0
	Fraqueza de uma das patas	1

	Fraqueza de ambas as patas	2
	Paralisia de uma das patas	3
	Paralisia de ambas as patas	4
Membro-anterior	Nenhum sinal clínico	0
	Fraqueza de uma ou ambas as patas	1
	Fraqueza de ambas as patas	2
Bexiga	Continência	0
	Incontinência	1

^a Pontuação numérica estabelecida arbitrariamente.

Fonte: Adaptado de De Paula *et al.*, (2008).

5.9 EUTANASIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS E TECIDOS DO EXPERIMENTO DE EAE

A eutanásia foi realizada com dose letal de Xilazina (10 mg/kg) e Ketamina (150 mg/kg) por via intraperitoneal para a coleta do cérebro, medula espinhal e linfonodos inguinais, no 21^o dpi. Após estarem completamente anestesiados, vinte animais (4 animais/grupo) foram submetidos a perfusão cardíaca com uma solução de formalina a 4% para a retirada do cérebro e da medula espinhal para a análise histológica. Vinte e cinco animais (5 animais/grupo) foram perfundidos no ventrículo esquerdo com solução tampão fosfato (PBS) para a retirada da medula espinhal para a quantificação de citocinas por ELISA, os tecidos retirados foram rapidamente armazenados em freezer -80°C. Em vinte e cinco animais (5 animais/grupo), células do cérebro e linfonodos inguinais destinados a citometria de fluxo foram coletados e imediatamente processados para separação e estas células foram submetidas aos protocolos de marcação extracelular e intracelular.

5.10 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA DO EXPERIMENTO DE EAE

Para a avaliação dos níveis de citocinas, porções da medula espinhal congeladas a -80°C foram descongelados e macerada em tampão de extração de citocinas (100mg/mL) composto de: 0,4 M de cloreto de sódio (NaCl) (Isofar Indústria e Comércio), 0,05% de tween 20 (Isofar Indústria e Comércio), 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma), 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil (Sigma), 0,1 M de cloreto de benzetônio (Sigma), 10 mM de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (Sigma) e 20 pM de aprotinina

(Sigma). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 2000xg por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80°C. As concentrações de citocinas IL-6, IL-12, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes foram determinadas pelo método ELISA. As placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico e incubadas por 18 horas a 4°C. Em seguida, lavadas quatro vezes com PBS-Tween e bloqueadas com PBS + Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas novamente quatro vezes e, em seguida, as amostras dos animais utilizados e os padrões de citocinas foram adicionados. As placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes, o 2º anticorpo biotilado e o complexo enzimático acrescentado e a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas seis vezes e a reação revelada pela adição do substrato contendo TMB (BD *Biosciences*, *San Diego*, CA, USA) e bloqueio com ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, *Molecular Devices*) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes (IL-6, IL-12, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, BD *Biosciences Pharmigen*, *San Diego*, CA, USA).

5.11 ISOLAMENTO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DOS LINFONODOS INGUINAIS E CÉREBRO DO EXPERIMENTO DE EAE

Os linfonodos inguinais e cérebro coletados no 21º dpi, para realização da citometria de fluxo, foram macerados em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. O macerado foi passado por um filtro de 70 μ m (BD *Biosciences*, *Bedford*, USA). As células dos linfonodos inguinais e cérebro foram posteriormente incubadas com RPMI contendo 2mg de colagenase D (*Roche*, *Mannheim*, *Germany*) a 37°C por 45 minutos, submetidas a uma constante agitação. As células mononucleares dos linfonodos inguinais e cérebro foram separadas por gradiente de Percoll e submetidas a uma lavagem com solução de PBS, 1% SFB e 0.09% de azida sódica. A seguir as células foram lavadas em solução de tampão de lise, centrifugadas a 1500 rpm ou 350xg por 5 minutos e resuspensas em PBS, 1% de SFB e 0.09% de azida sódica.

5.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO DO EXPERIMENTO DE EAE

Células isoladas dos linfonodos inguinais e cérebro foram incubadas com anticorpos CD4-PerCP, CD8-PerCP, CD80-PerCP, CD25-FITC, MHC classe II I-AD-aloficocianina (apc), CD86-PerCP, CD11c-FITC, (BD *Biosciences Pharmingen, San Diego, USA*). Após 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas com tampão de marcação PBS, 1% SFB e 0.09% de azida sódica e tampão de fixação contendo paraformaldeído (BD *Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA*) e lavadas em tampão de permeabilização (BD *Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA*). Após as marcações extracelulares as células foram submetidas às marcações intracelulares com anticorpos anti-camundongo IFN- γ -PE-Cy-7, IL-10-PE, IL-17A-Alexa Fluor 488, Foxp3-Alexa Fluor 488, (BD *Biosciences Pharmingen, San Diego, USA*). A captura das células foi feita utilizando-se o citômetro de fluxo FACScalibur® (*Becton Dickinson, EUA*) e as análises realizadas com *FCS Express version 3*.

5.13 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA DO EXPERIMENTO DE EAE

As medulas espinhais e os cérebros foram coletados para análise do infiltrado inflamatório no 21º dia após indução. Os órgãos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e posteriormente incluídos em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes transversais de 5 μ m de espessura para a coloração em hematoxilina-eosina (H&E). Também foram realizados cortes longitudinais da medula. O processo de coloração em H&E ocorreu com a imersão das lâminas em xilol I, II e III, durante 5 minutos para a desparafinização. Em seguida, estas lâminas foram imersas durante 3 minutos em banhos de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70% e água destilada por 5 minutos para a hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante específico, seguindo as exigências da técnica de H&E para a avaliação do infiltrado celular. As lâminas foram imersas em hematoxilina (corante ácido) por dois minutos, em seguida lavadas em água corrente por quatro minutos e imersas em água destilada por 2 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante eosina (corante básico), por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram desidratadas, sendo imersas na bateria de álcool 70%, álcool 80%, álcool 95% e álcool absoluto e xilol IV, V e VI. Posteriormente, os cortes foram montados com meio de montagem *Erv-Mount (EasyPath, Erviegas, São Paulo, SP)*

entre lâminas e lamínulas. As imagens foram obtidas usando o microscópio *Olympus BX51* e os resultados registrados pelo software *Image Pro plus (Media Cybernetics TM)*. Avaliação histológica semiquantitativa para a inflamação foi pontuada de forma cega por um patologista usando uma escala de 0 a 5 com base na porcentagem aproximada de tecido envolvido com 0 = nenhum, 1= mínimo (1-5%), 2 = leve (6-10%), 3= moderado (11-25%), 4= grave (26–50%) e 5= acentuado (>50%) (PANT *et al.*, 2017).

5.14 COLORAÇÃO POR *LUXOL FAST BLUE* DO EXPERIMENTO DE EAE

As medulas espinhais os cérebros foram coletados para análise da desmielinização no 21º dia após indução. Os órgãos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e posteriormente incluídos em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes transversais 10 µm de espessura para a coloração de *luxol fast blue* (LFB) e visualização da desmielinização. Também foram realizados cortes longitudinais da medula. O processo de coloração ocorreu com a imersão das lâminas em xilol I, II e III, durante 5 minutos para a desparafinização. Em seguida, estas lâminas foram imersas durante 3 minutos em banhos de álcool absoluto e álcool 95%. Posteriormente, os cortes permaneceram imersos em LFB durante a noite em estufa a 56°C, em recipiente bem vedado para não evaporar. No dia seguinte foi retirado o excesso de corante com álcool 95% e as lâminas enxaguadas em água destilada. A diferenciação das lâminas foi realizada uma a uma na solução de carbonato de lítio, cerca de 1 minuto para a retirada do excesso de corante. Seguiu-se a diferenciação em álcool 70% agitando-se gentilmente até que a diferença entre substância branca e cinzenta ficasse nítida. A sequência do carbonato de lítio e álcool 70% foi repetida quando necessário, até a substância cinzenta ficar bem clara (acompanhamento ao microscópio). Terminada a diferenciação as lâminas foram coletadas em água destilada. Seguiu-se a coloração pela solução de cresil violeta durante 6 min e a desidratação rapidamente em etanol 95% e absoluto para posterior montagem em *Erv-Mount (EasyPath, Erviagas, São Paulo, SP)*. As imagens foram obtidas usando o microscópio *Olympus BX51* e os resultados registrados pelo software *Image Pro plus (Media Cybernetics TM)*. Avaliação histológica semiquantitativa para a inflamação foi pontuada de forma cega por um patologista usando uma escala de 0 a 5 com base na porcentagem aproximada de tecido envolvido com 0 = nenhum, 1= mínimo (1-5%), 2 = leve (6-10%), 3= moderado (11-25%), 4= grave (26–50%) e 5= acentuado (>50%) (Pant *et al.*, 2017).

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

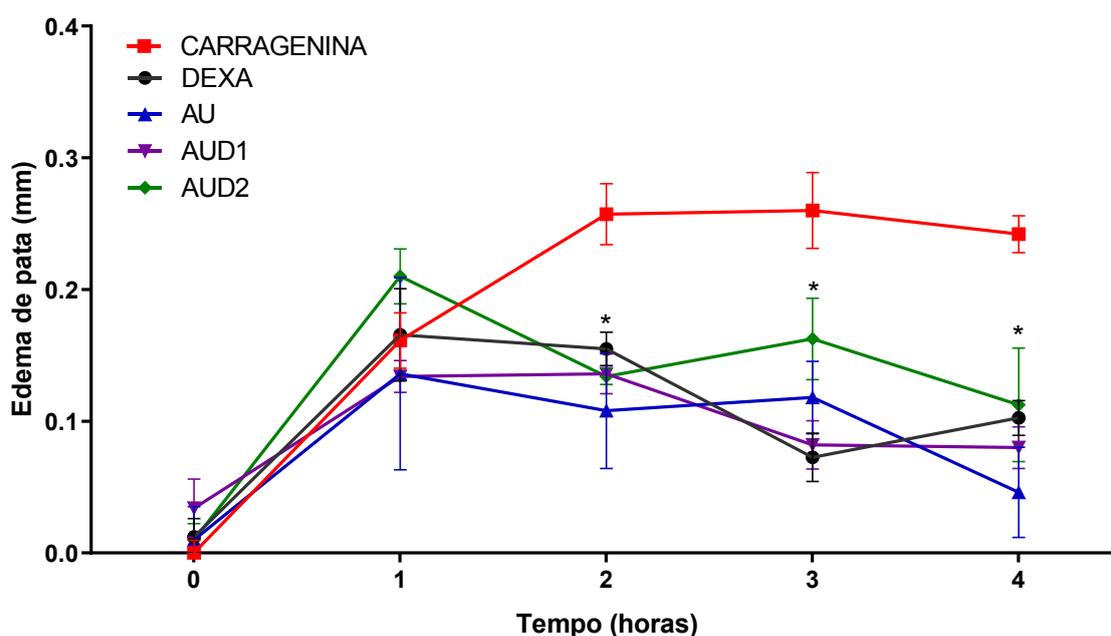
Os resultados foram representados por média \pm erro padrão. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste paramétrico t' student, de acordo com a análise de variância dos dados e *One-Way* ANOVA, com o pós-teste Bonferroni para comparações múltiplas, para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5.0.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM OS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Os tratamentos com AU e seus derivados AUD1 e AUD2 apresentaram redução efetiva do edema de pata de camundongos BALB/c fêmeas, assim como a dexametasona, em comparação ao grupo carragenina, que recebeu apenas tratamento com PBS. A redução do edema de pata foi observada em 2h e persiste até as 4h (Figura 11).

Figura 11 - Edema de pata induzido por carragenina.



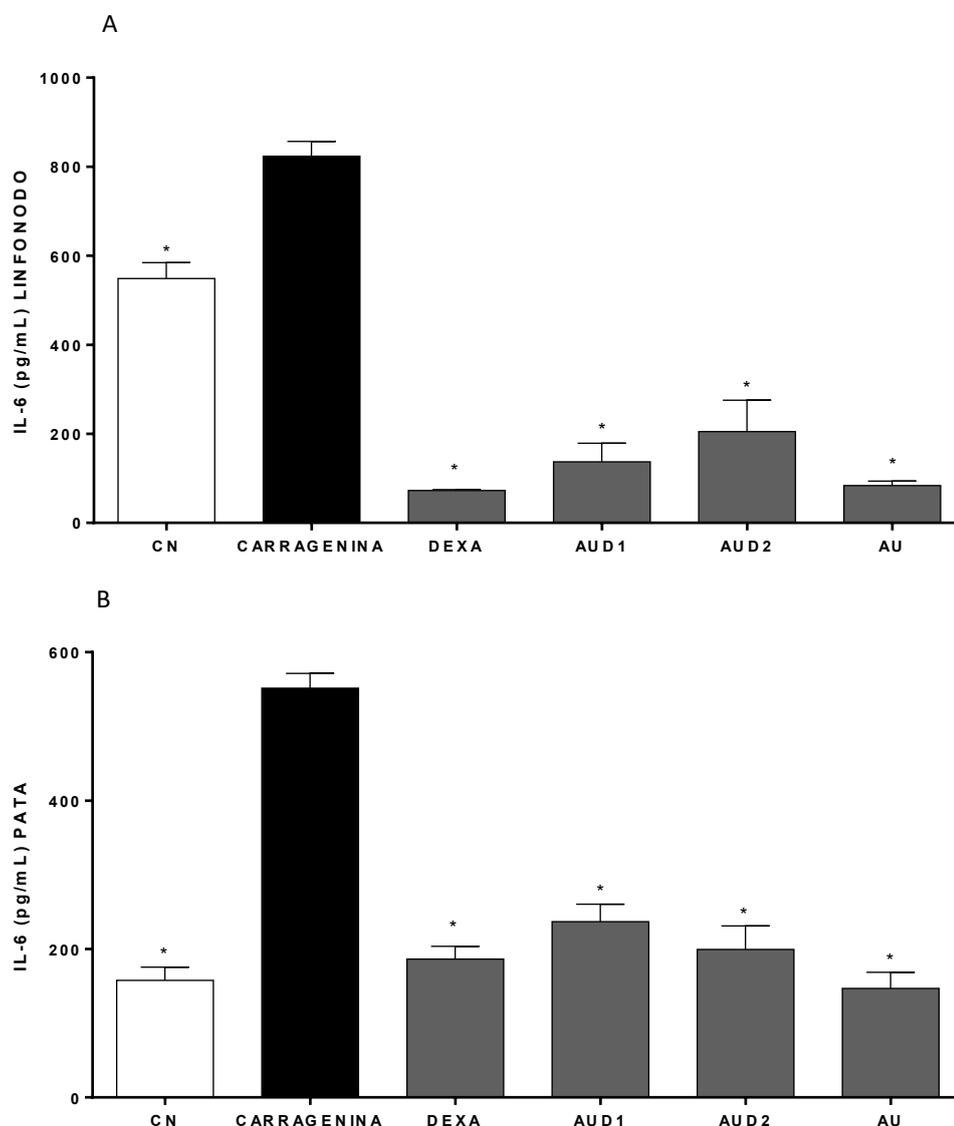
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Camundongos BALB/c fêmeas (n=6 animais/grupo) foram tratados i.p. (100 µL) com PBS (Grupo CARRAGENINA), AUD1 (200 mg/Kg), AUD2 (200 mg/Kg), AU (200 mg/ Kg) ou DEXA (0,5 mg/Kg), 30 minutos antes da indução do modelo. DEXA= grupo imunizado e tratado com dexametasona, CARRAGENINA= grupo imunizado tratado com PBS, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Edema da pata [Edema da pata (mm)] = [espessura da pata de carragenina (mm)] – [espessura da pata de PBS (mm)] foram monitorados até 4 horas. Cada ponto representa a média ± SEM.*p<0,05 AUD1, AUD2, AU e DEXA *versus* grupo CARRAGENINA. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

6.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA IL-6 NO SOBRENADANTE DO HOMOGENATO DO TECIDO DA PATA E DOS LINFONODOS INGUINAIS

Em relação à análise de citocina no sobrenadante do macerado de tecido da pata e dos linfonodos dos camundongos BALB/c fêmeas, foi observado uma redução da IL-6 nos grupos induzidos e tratados com o AU e os derivados AUD1 e AUD2 comparados com o grupo carragenina (p< 0,05) (Figuras 12A e 12B).

Figura 12 - Concentração da citocina IL-6 no sobrenadante do homogenato em linfonodos inguinais e de tecido de pata.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

(A) Citocina IL-6 determinada no sobrenadante do homogenato de linfonodos inguinais e (B) patas por ELISA. Camundongos BALB/c fêmeas (n= 6 animais/grupo) foram tratados i.p. (100 μ L) com PBS (grupo CARRAGENINA), AUD1 (200 mg/Kg), AUD2 (200 mg/Kg), AU (200 mg/Kg) ou DEXA (0,5 mg/Kg) e CN, 30 minutos antes da indução do modelo. CN=grupo não imunizado e não tratado, CARRAGENINA= grupo imunizado tratado com PBS, DEXA= grupo imunizado e tratado com dexametasona, AUD1= grupo imunizado tratado com 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila e AUD2= grupo imunizado tratado com 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila e AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico. Cada barra representa a média \pm SEM. *p<0,05 AUD1, AUD2, AU, DEXA e CN *versus* grupo CARRAGENINA. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

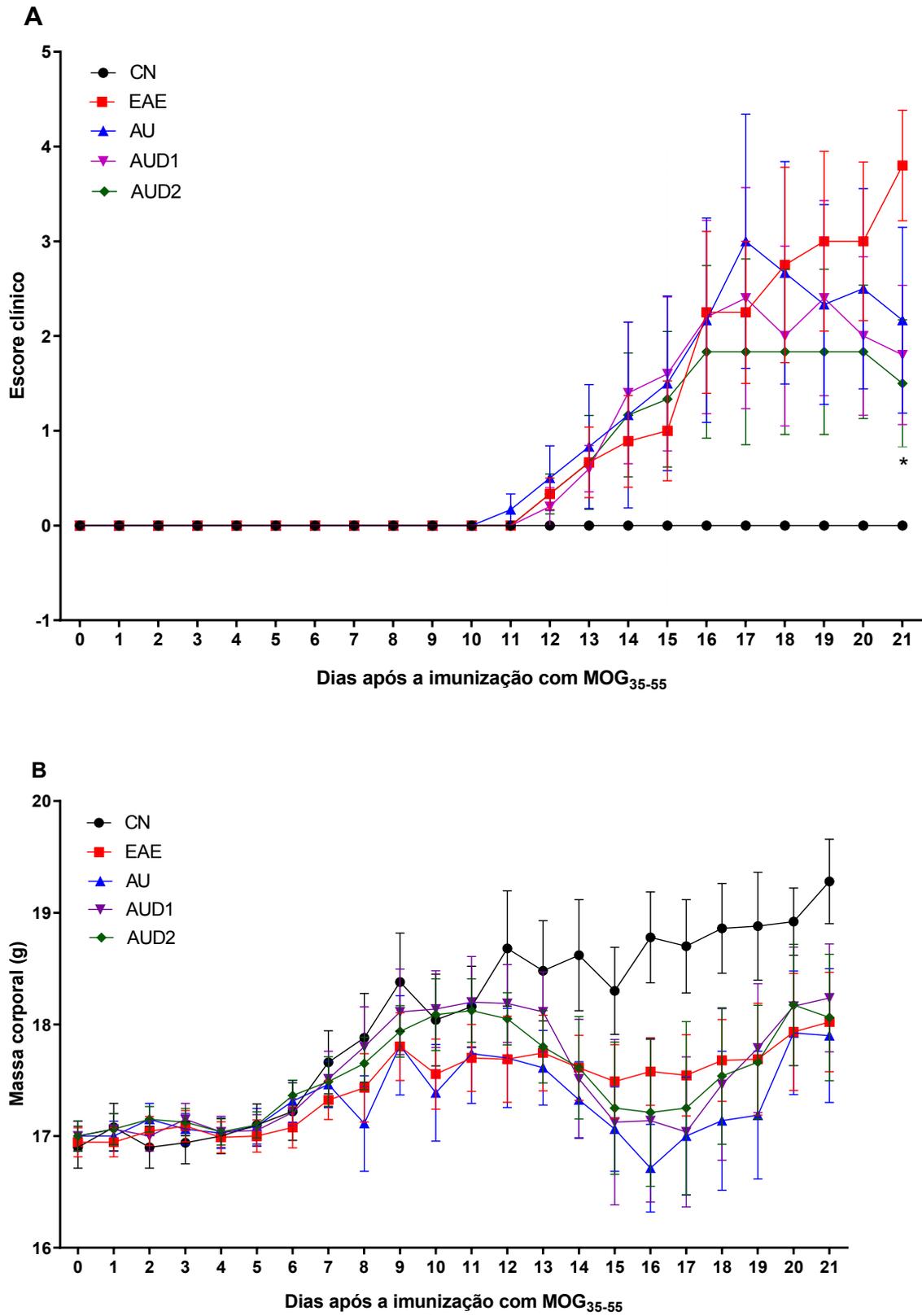
6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com AU, AUD1 ou AUD2 no 15º dia após a indução (Figura 13A), 14 animais/grupo foram acompanhados diariamente durante 21 dias após indução para avaliação do curso clínico da EAE e da massa corporal.

Para o grupo controle, não imunizado, durante todo o período avaliado não foi observado nenhum sinal clínico neurológico da EAE (Figura 13A). Por outro lado, os animais do grupo EAE desenvolveram sinais clínicos, sendo o 12º dia após a indução o início dos sinais clínicos da doença e o pico máximo de pontuação clínica ocorreu no 21º dia após a indução (Figura 13A). Houve redução significativa no escore clínico dos grupos tratados em relação ao grupo EAE no 21º dia após a indução ($p < 0,05$) (Figura 13A).

Para os níveis médios da massa corporal dos camundongos dos grupos EAE, AU, AUD1 e AUD2 não foi observada diferença entre os grupos (Figura 13B).

Figura 13 - Média do escore clínico e massa corporal



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

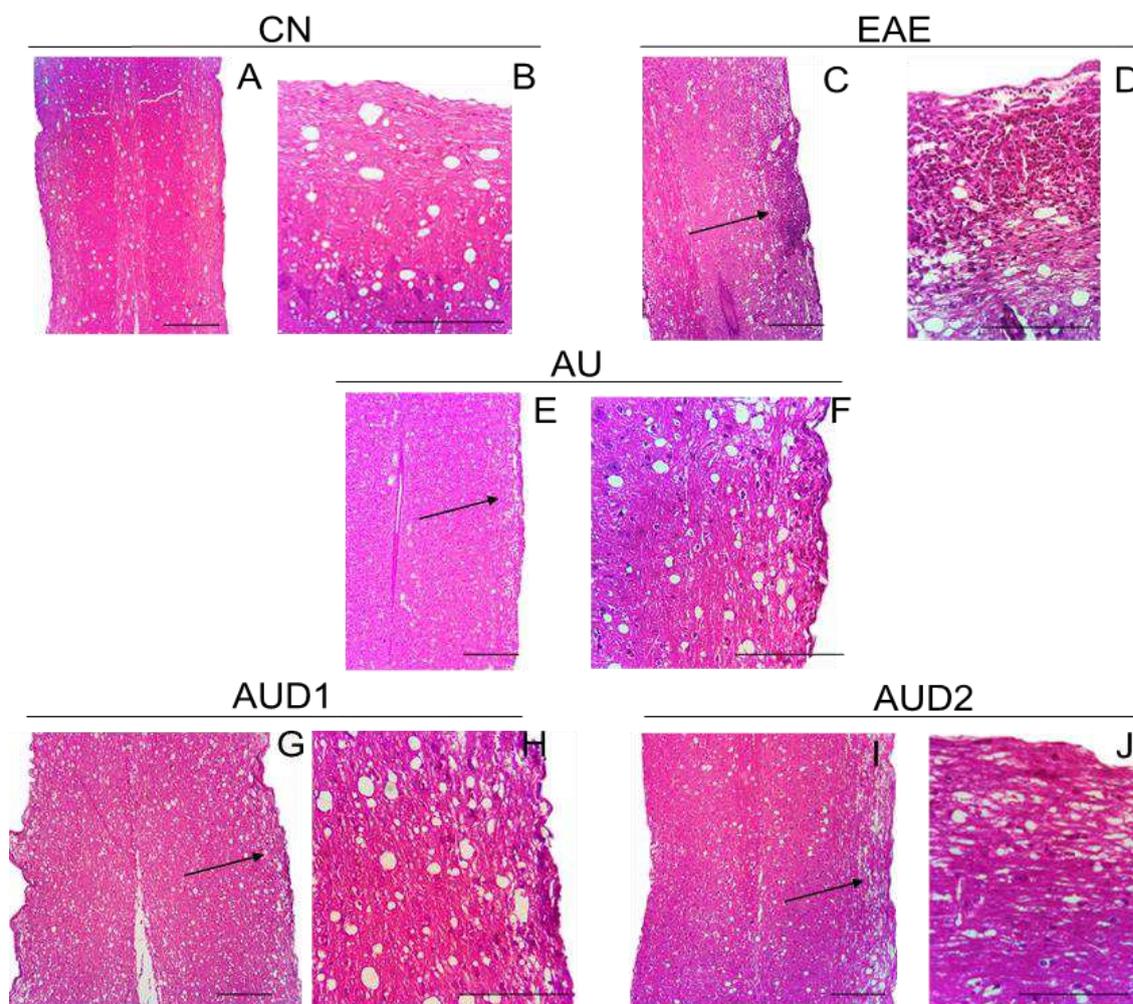
(A) Escore clínico de camundongos C57BL/6 (n=14 animais/grupo) imunizados ou não com peptídeo

MOG₃₅₋₅₅. (B) Massa corporal dos camundongos C57BL/6 (n=14animais/grupo) imunizados ou não com peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Os sinais clínicos foram registrados do dia 0 até o 21° dia após a imunização. Os tratamentos com AU, AUD1 e AUD2 tiveram início no 15° dia após a imunização. CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada ponto representa a média ± SEM. *p<0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

6.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE

A avaliação do infiltrado inflamatório da medula espinhal foram realizadas no 21° dia após a indução em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com AU, AUD1 ou AUD2 no 15° dia após a indução. A Figura 14 exhibe cortes longitudinais, enquanto a Figura 15 apresenta cortes transversais, de medula espinhal corados com H&E, permitindo a avaliação da presença de infiltrado inflamatório. Os animais do grupo CN, apresentaram padrão parenquimatoso habitual na medula espinhal, sem presença de infiltrado celular inflamatório (Figuras 14A, 14B, 15A e 15B). Em contraste, os animais do grupo EAE apresentaram infiltrados de células inflamatórias, quando comparado ao grupo CN (Figuras 14C, 14D, 15C e 15D). Os tratamentos com AU, AUD1 e AUD2 demonstraram uma redução no infiltrado de células inflamatórias em comparação ao grupo EAE (Figuras 14E, 14F, 14G, 14H, 14I, 14J, 15E, 15F, 15G, 15H, 15I e 15J).

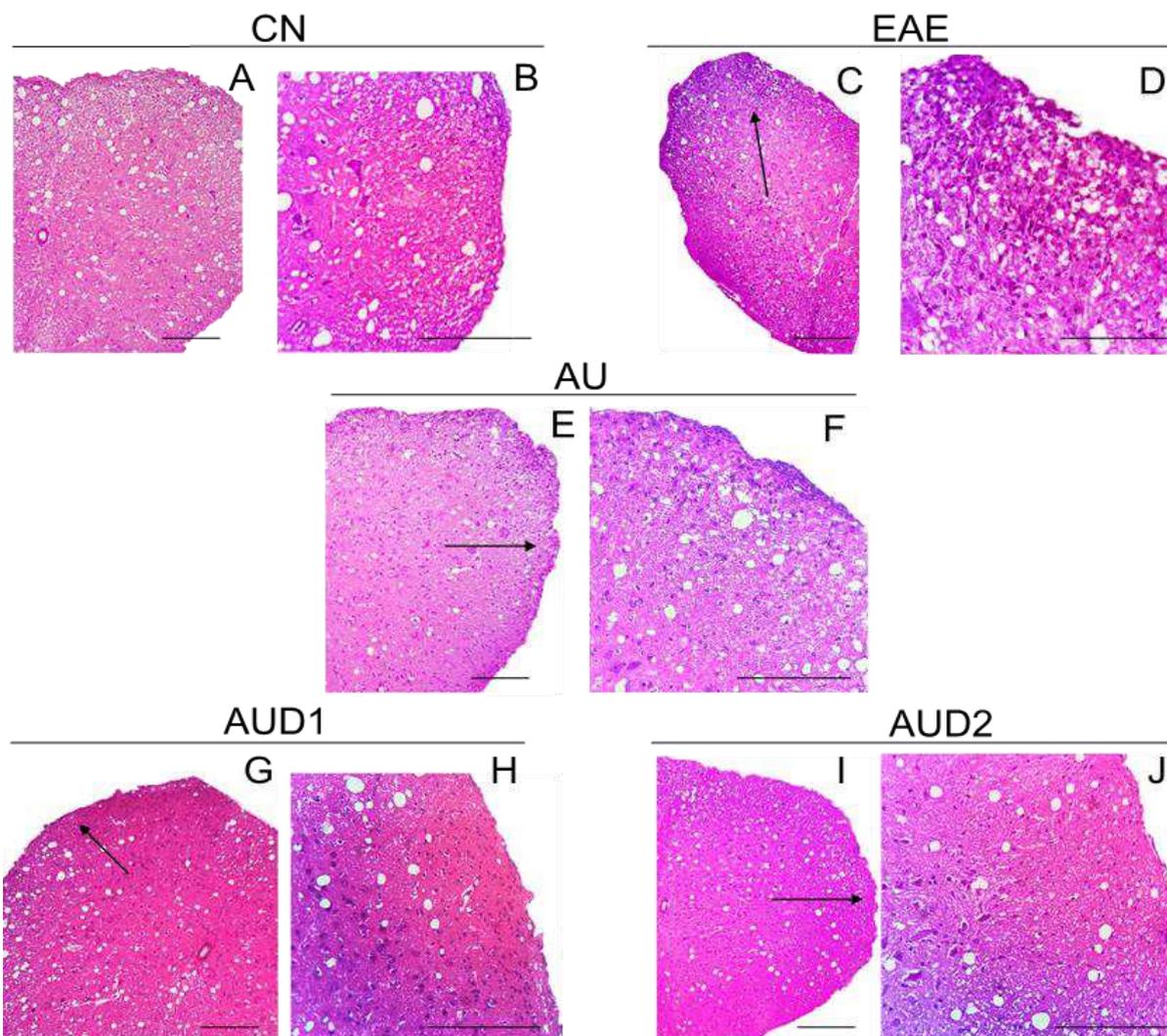
Figura 14 - Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes longitudinais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes longitudinais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=4 animais/grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A, B), EAE= grupo imunizado não tratado (C, D), AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico (E, F) e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-em-28-oato de metila (G, H), AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-em-28-oato de metila (I, J). Magnificação de 10x (Figuras A, C, E, G, I), 40x (Figuras B, D, F, H, J), escala da barra= 100µm (10x) e 50µm (40x). Setas indicam os infiltrados celulares.

Figura 15 - Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

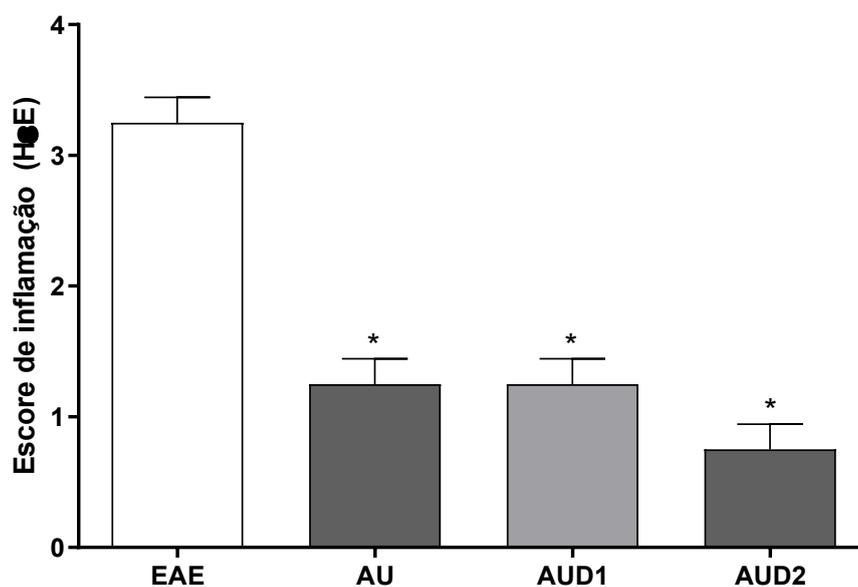
Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=4 animais/grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A, B), EAE= grupo imunizado não tratado (C, D), AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico (E, F) e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-em-28-oato de metila (G, H), AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-em-28-oato de metila (I, J). Magnificação de 10x (Figuras A, C, E, G, I), 40x (Figuras B, D, F, H, J), escala da barra= 100µm (10x) e 50µm (40x). Setas indicam os infiltrados celulares.

6.5 ESCORE DE INFLAMAÇÃO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com AU, AUD1 ou AUD2 no 15º dia após a indução, a medula espinhal de 4 animais/grupo foi coletada para a avaliação do escore de inflamação no 21º dia após a indução.

Os escores de inflamação (Figura 16) foram avaliados de forma cega por um patologista e mostrou que os tratamentos com os AU, AUD1 e AUD2 reduziram significativamente o infiltrado de células inflamatórias na medula espinhal, quando comparado com o grupo de EAE.

Figura 16 - Escore de inflamação de cortes longitudinais e transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Escore de inflamação realizado através da análise histológica com a coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais e longitudinais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=4 animais/grupo). Os tratamentos com AU, AUD1 e AUD2 tiveram início no 15º dia após a imunização. EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada ponto representa a média ± SEM. *p<0,05 versus EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

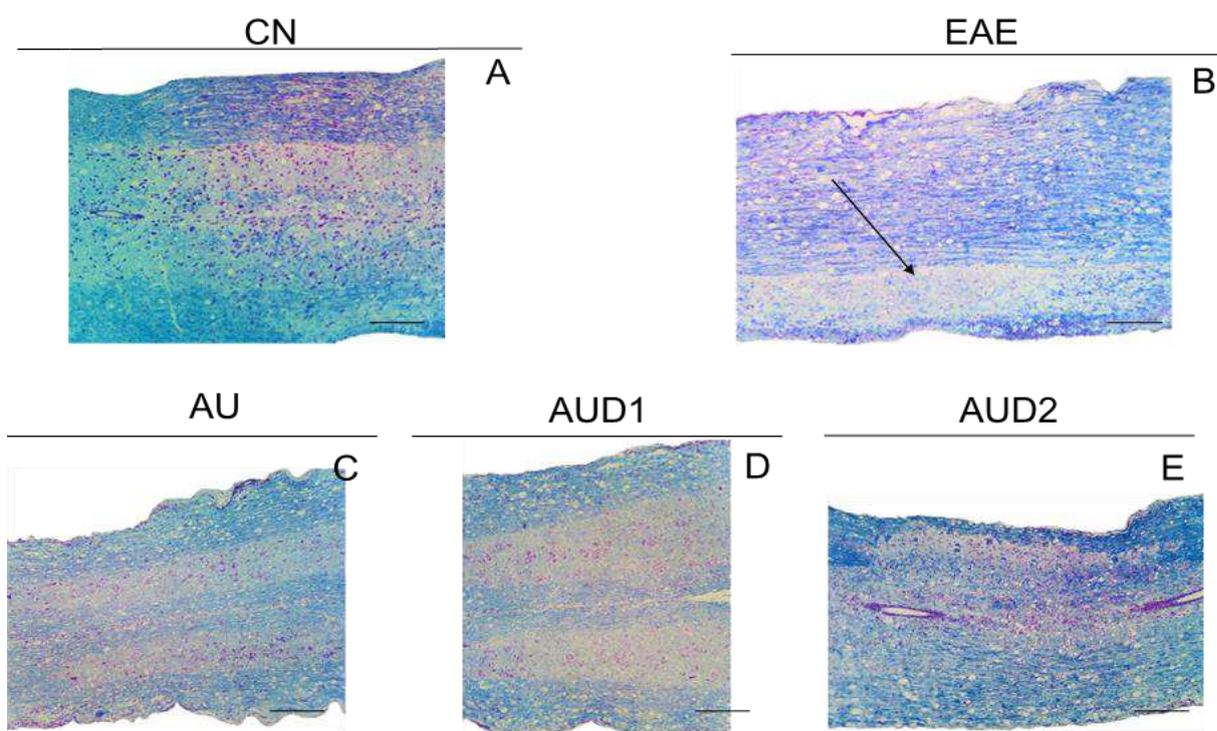
6.6 AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA DESMIELINIZAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL COM EAE

A avaliação da desmielinização da medula espinhal foi realizada no 21º dia após a imunização. A Figura 17 mostra os cortes longitudinais e a Figura 18 cortes transversais da medula espinhal corados com *luxol fast blue* para avaliação da presença de desmielinização.

Os animais do CN, não imunizado, não apresentaram focos de desmielinização no cérebro (Figuras 17A e 18A).

Os animais do grupo EAE (Figuras 17B e 18B), apresentaram maior número e focos mais extensos de desmielinização na medula, quando comparado aos animais dos grupos tratados com AU, AUD1 e AUD2, no 21º dia pós indução (Figuras 17C, 17D, 17E, 18C, 18D e 18E).

Figura 17 - Análise histológica através da coloração de luxol fast blue de cortes longitudinais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21º dia pós indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.

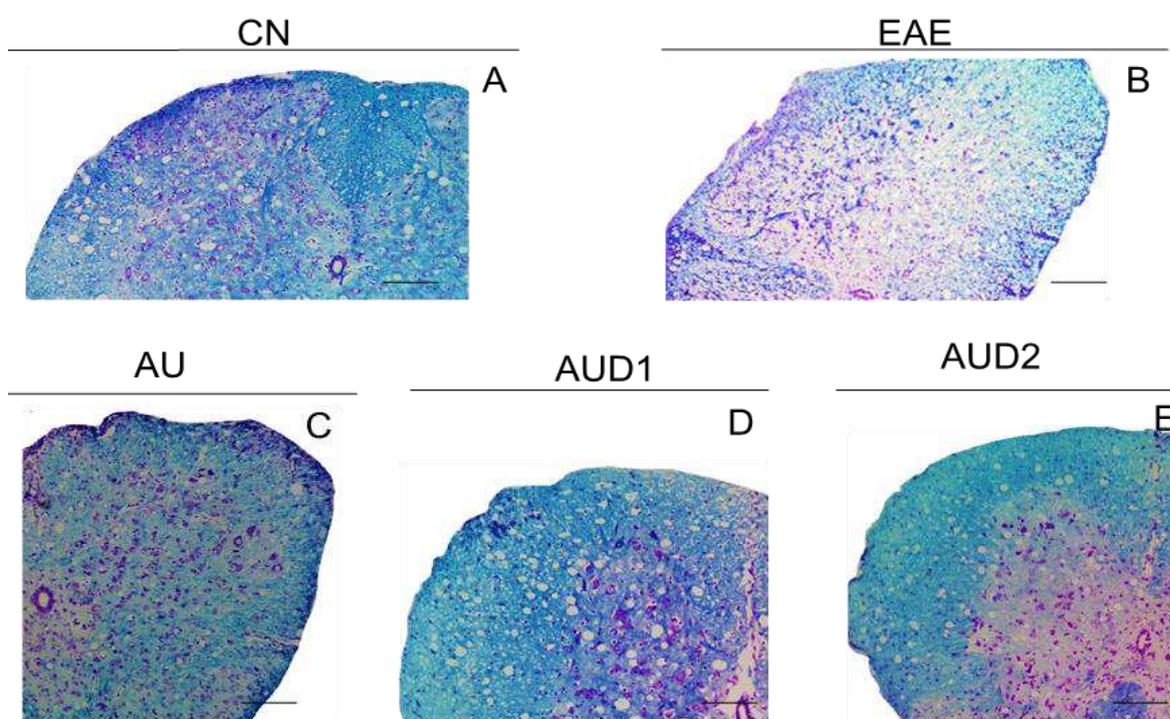


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Análise histológica através da coloração de *luxol fast blue* de cortes longitudinais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=4 animais/ grupo). As figuras

são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A), EAE= grupo imunizado não tratado (B), AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico (C) e AUD1= grupo imunizado tratado com 3 β -hidroxi-urs-12-em-28-oato de metila (D), AUD2= grupo imunizado tratado com 3 β -acetoxi-urs-12-em-28-oato de metila (E). Magnificação de 10x e escala da barra= 100 μ m.

Figura 18 - Análise histológica através da coloração de luxol fast blue de cortes transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21 $^{\circ}$ dia pós indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Análise histológica através da coloração de *luxol fast blue* de cortes transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21 $^{\circ}$ dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=4 animais/ grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A), EAE= grupo imunizado não tratado (B), AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico (C) e AUD1= grupo imunizado tratado com 3 β -hidroxi-urs-12-em-28-oato de metila (D), AUD2= grupo imunizado tratado com 3 β -acetoxi-urs-12-em-28-oato de metila (E). Magnificação de 10x e escala da barra= 100 μ m.

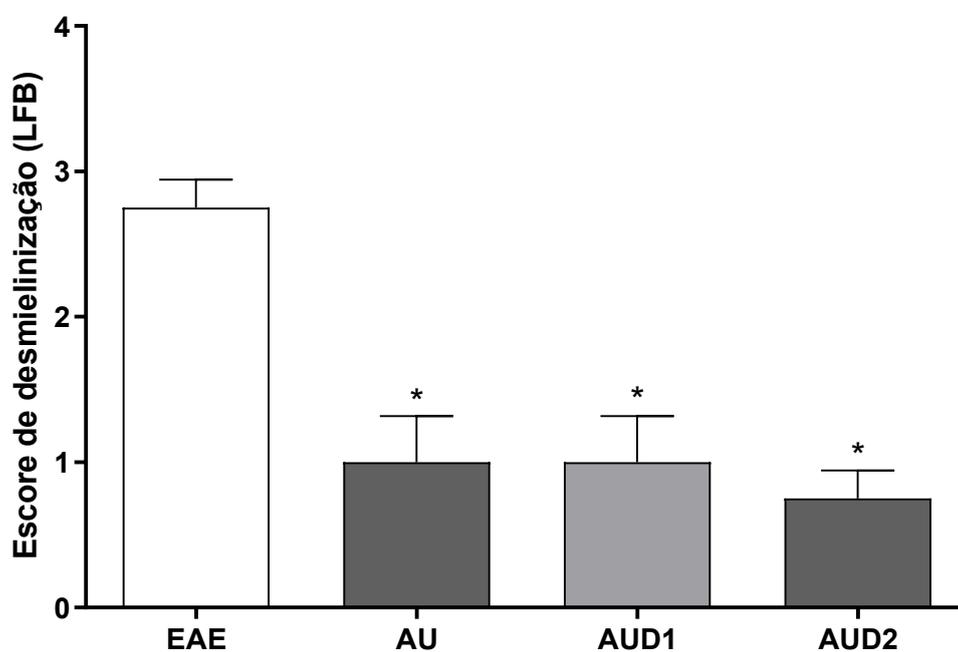
6.7 ESCORE DE DESMIELINIZAÇÃO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com AU, AUD1

ou AUD2 no 15° dia após a indução, a medula espinhal de 4 animais/grupo foi coletada para a avaliação do escore de desmielinização no 21° dia após a indução.

Os escores de desmielinização (Figura 19) foram avaliados de forma cega por um patologista e mostrou que os tratamentos com os AU, AUD1 e AUD2 reduziram significativamente a desmielinização na medula espinhal, quando comparado com o grupo de EAE.

Figura 19 - Escore de desmielinização de cortes longitudinais e transversais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21° dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Escore de desmielinização realizado através da análise histológica com a coloração de *luxol fast blue* de cortes transversais e longitudinais da medula espinhal de camundongos C57BL/6 no 21° dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=4 animais/grupo). Os tratamentos com AU, AUD1 e AUD2 tiveram início no 15° dia após a imunização. EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada ponto representa a média ± SEM. *p<0,05 versus EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

6.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO CÉREBRO DOS ANIMAIS COM EAE

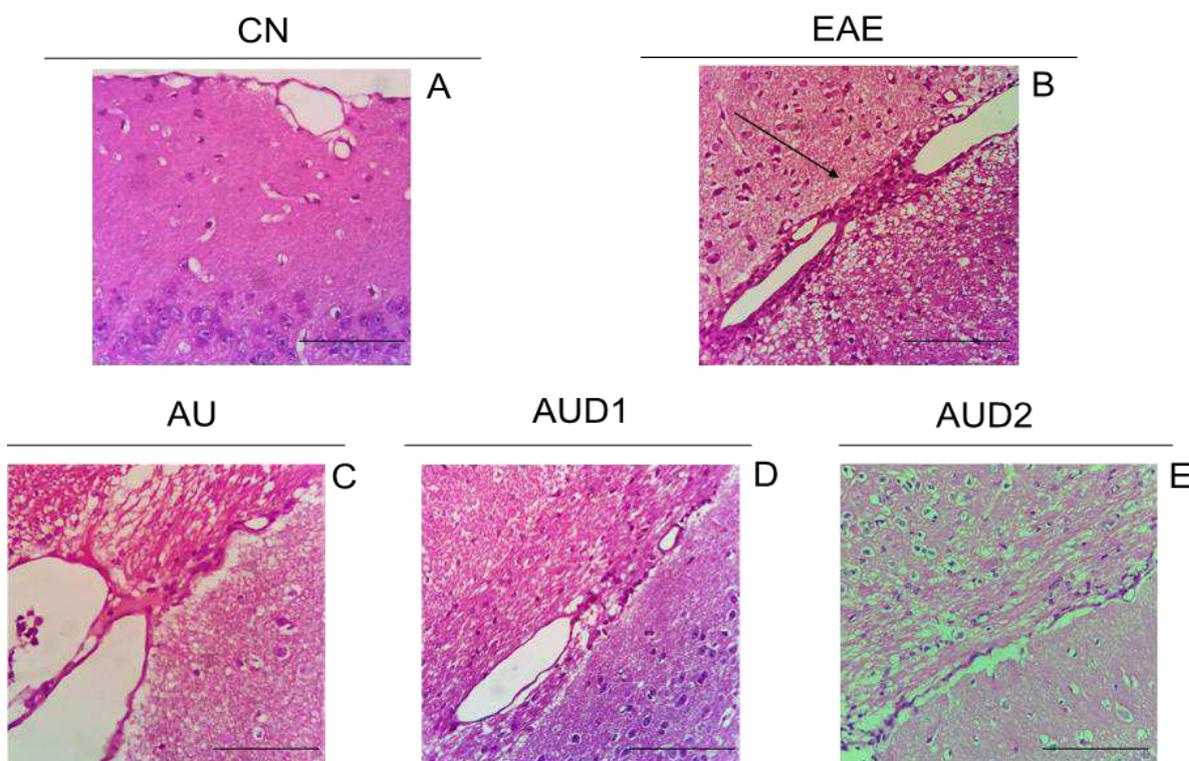
A avaliação do infiltrado inflamatório do cérebro foi realizada no 21º dia após a imunização. A Figura 20 mostra os cortes transversais do cérebro corados com H&E para avaliação da presença de infiltrado inflamatório.

Os animais do grupo CN, apresentaram padrão parenquimatoso habitual no cérebro, sem presença de infiltrado celular inflamatório (Figuras 20A e 20B).

Os animais do grupo EAE apresentaram infiltrados de células inflamatórias, quando comparado ao grupo CN (Figuras 20C e 20D).

Os tratamentos com AU, AUD1 e AUD2 (Figuras 20C, 20D e 20E) reduziram o infiltrado de células inflamatórias, quando comparado com o grupo de EAE (Figura 20B).

Figura 20 - Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes longitudinais do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21º dia pós indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina (H&E) de cortes longitudinais do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=4 animais/grupo). As figuras

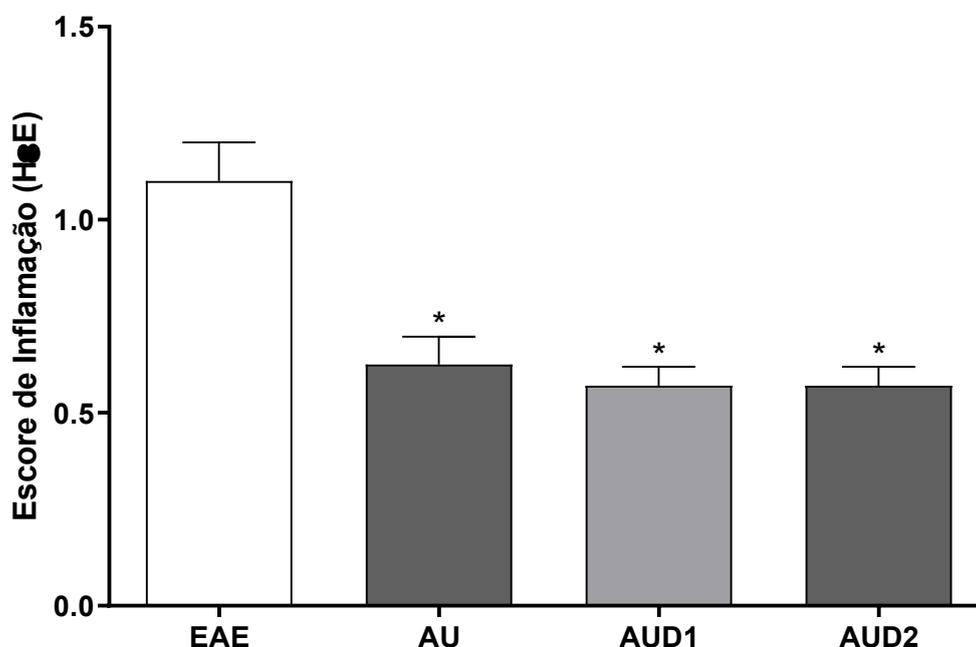
são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A), EAE= grupo imunizado não tratado (B), AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico (C) e AUD1= grupo imunizado tratado com 3 β -hidroxi-urs-12-em-28-oato de metila (D), AUD2= grupo imunizado tratado com 3 β -acetoxi-urs-12-em-28-oato de metila (E). Magnificação de 40x e escala da barra= 50 μ m. Setas indicam os infiltrados celulares.

6.9 ESCORE DE INFLAMAÇÃO NO CÉREBRO DOS ANIMAIS COM EAE

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com AU, AUD1 ou AUD2 no 15º dia após a indução, a medula espinhal de 4 animais/grupo foi coletada para a avaliação do escore de inflamação no 21º dia após a indução.

Os escores de desmielinização (Figura 21) foram avaliados de forma cega por um patologista e mostrou que os tratamentos com os AU, AUD1 e AUD2 reduziram significativamente a inflamação na medula espinhal, quando comparado com o grupo de EAE.

Figura 21 - Escore de inflamação de cortes longitudinais do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

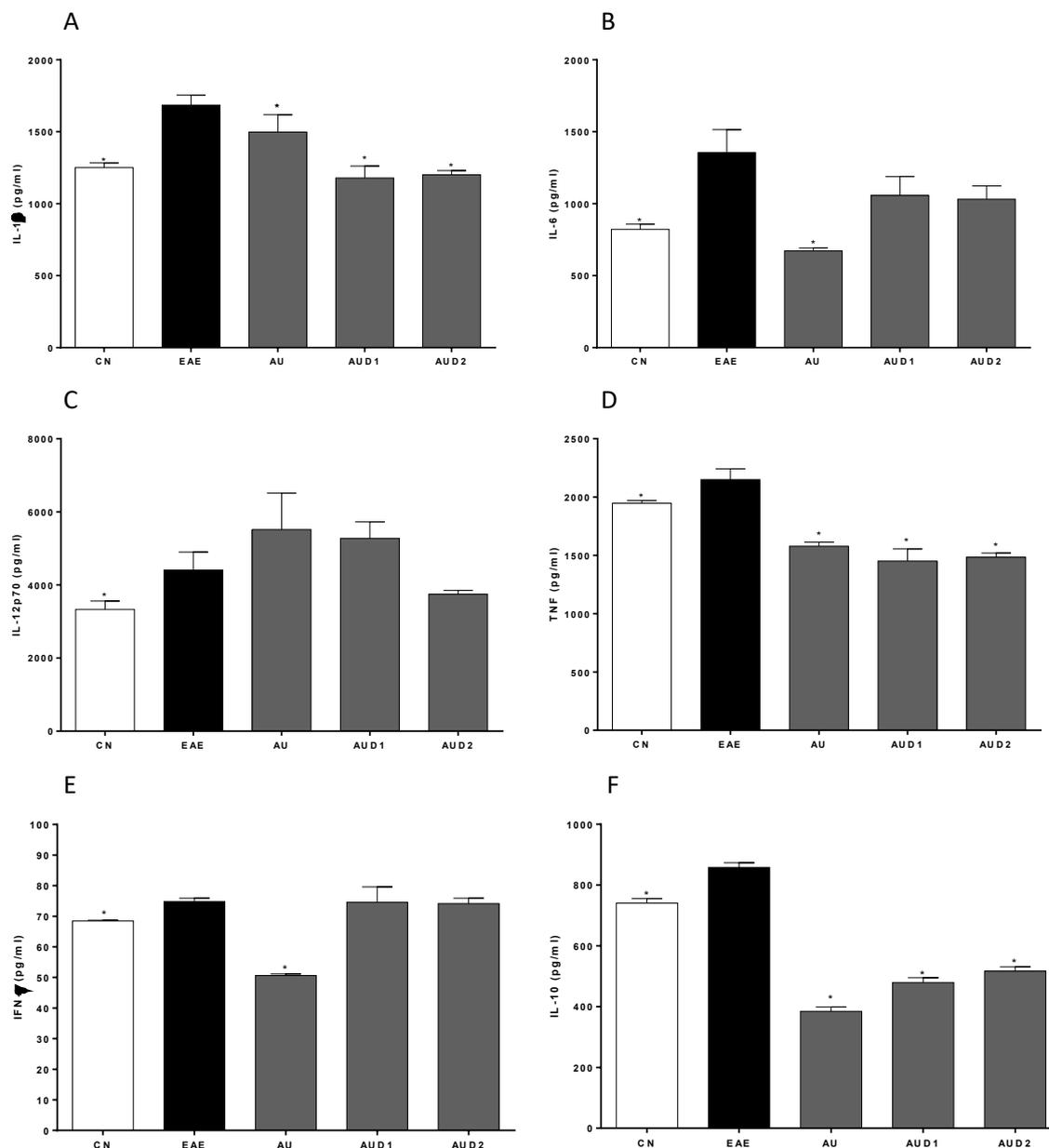
Escore de inflamação realizado através da análise histológica com a coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅

(n=4 animais/grupo). Os tratamentos com AU, AUD1 e AUD2 tiveram início no 15º dia após a imunização. EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada ponto representa a média ± SEM. *p<0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

6.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS IL-1β, IL-6, IL-12P70, TNF-α, IFN-γ, IL-10 NO SOBRENADANTE DO HOMOGENATO DA MEDULA ESPINHAL POR ELISA NO 21º DIA APÓS A INDUÇÃO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE

Os níveis de IL-1β, IL-6, IL-12p70, TNF-α, IFN-γ e IL-10 foram quantificados em sobrenadante de homogenato de medula espinhal no 21º dia após a indução. Os animais do grupo EAE apresentaram um aumento nos níveis IL-1β, IL-6, IL-12p70, TNF-α, IFN-γ e IL-10 quando comparado ao grupo controle (p<0,05) (Figura 22). Os grupos tratados com AU, AUD1 e AUD2 exibiram níveis inferiores de IL-1β, TNF-α e IL-10 em relação ao grupo EAE (p<0,05) (Figuras 22A, 22D e 22F). Em relação aos níveis de IL-6, apenas o tratamento com AU apresentaram menores níveis de IL-6 quando comparado com o grupo EAE (p<0,05) (Figura 22B). A dosagem de IFN-γ no homogenato do macerado da medula espinhal foi menor no grupo tratado com AU quando comparado com EAE (p<0,05) (Figura 22E). Nenhum dos grupos tratados apresentaram redução dos níveis de IL-12p70 quando comparado com o grupo EAE (p> 0,05) (Figura 22C).

Figura 22 - Concentração das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C), TNF- α (D), IFN- γ (E) e IL-10 (F) determinada no sobrenadante do homogenato da medula espinal por ELISA no 21 $^{\circ}$ dia pós indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



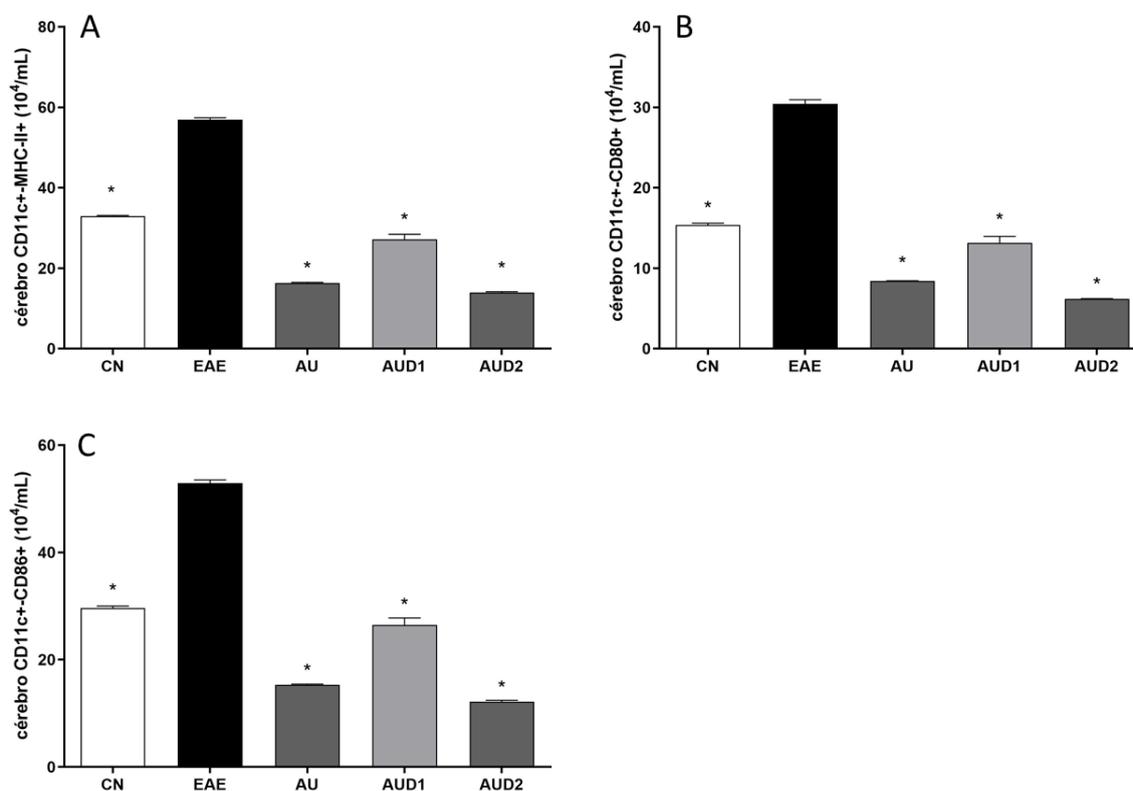
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C), TNF- α (D), IFN- γ (E) e IL-10 (F) determinada no sobrenadante do homogenato da medula espinal de camundongos C57BL/6 por ELISA no 21 $^{\circ}$ dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média \pm SEM. * = p < 0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

6.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES EM CÉLULAS DO CÉREBRO POR CITOMETRIA DE FLUXO NO 21º DIA APÓS A INDUÇÃO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE

Foi realizada a análise do número absoluto das células do cérebro no 21º dia após a indução. Os tratamentos com AU, AUD1 e AUD2 foram capazes de reduzir o número de células CD11c+MHCII+, CD11c+CD80+ e CD11c+CD86+ quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figuras 23A, 23B, 23C). Ao analisar o número de células CD4+ e CD8+, os tratamentos AU, AUD1 e AUD2 reduziram números dessas células quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figuras 24A, 24B). Os grupos tratados com AU, AUD1 e AUD2 reduziram as células CD4+IL-17+, CD4+IFN γ + e CD4+CD25+ quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figuras 25A, 25B e 25C). Os tratamentos com AU, AUD1 e AUD2 reduziram as células CD4+FOXP3+IL-10+ quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figura 26).

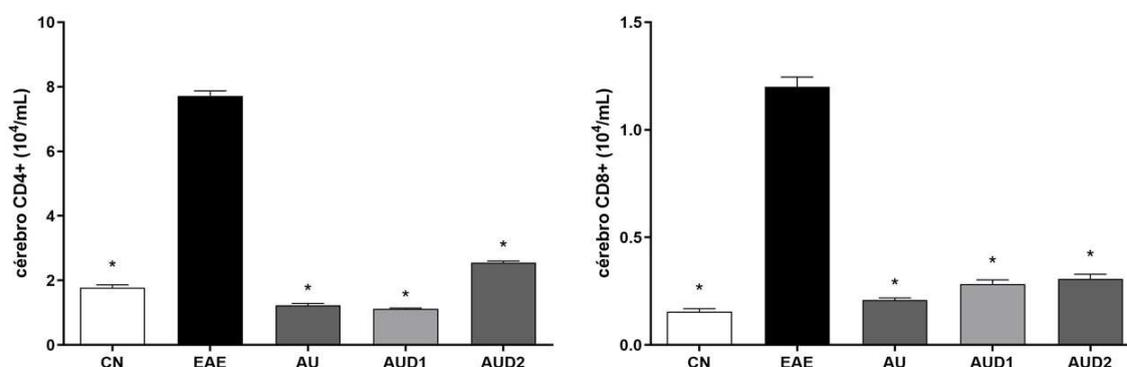
Figura 23 - Número absoluto de células CD11c+MHCII+(A), CD11c+CD80+(B) e CD11c+CD86+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Número absoluto de células CD11c+MHCII+(A), CD11c+CD80+(B) e CD11c+CD86+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxy-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média ± SEM. * = p < 0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

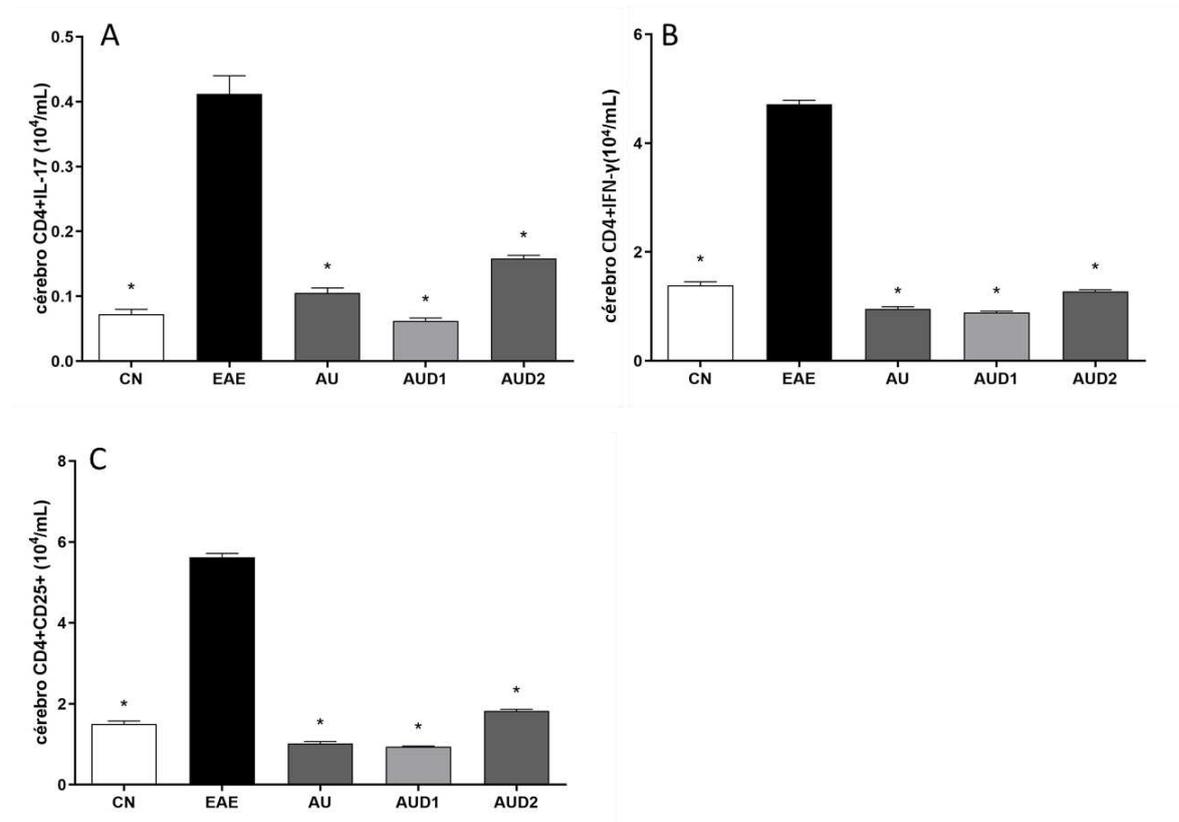
Figura 24 - Número absoluto de células CD4+(A) e CD8+(B) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Número absoluto de células CD4+(A) e CD8+(B) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média ± SEM. * = p < 0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

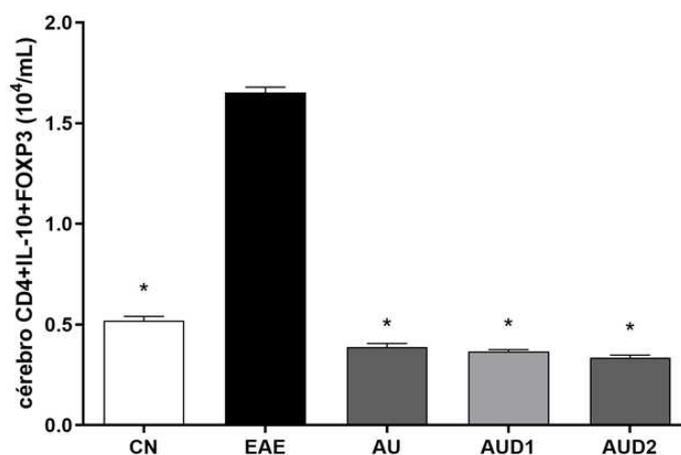
Figura 25 - Número absoluto de células CD4+IL-17+(A), CD4+IFN γ +(B) e CD4+CD25+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Número absoluto de células CD4+IL-17+(A), CD4+IFN γ +(B) e CD4+CD25+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média \pm SEM. *= p <0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

Figura 26 - Número absoluto de células CD4+FOXP3+IL-10+ determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



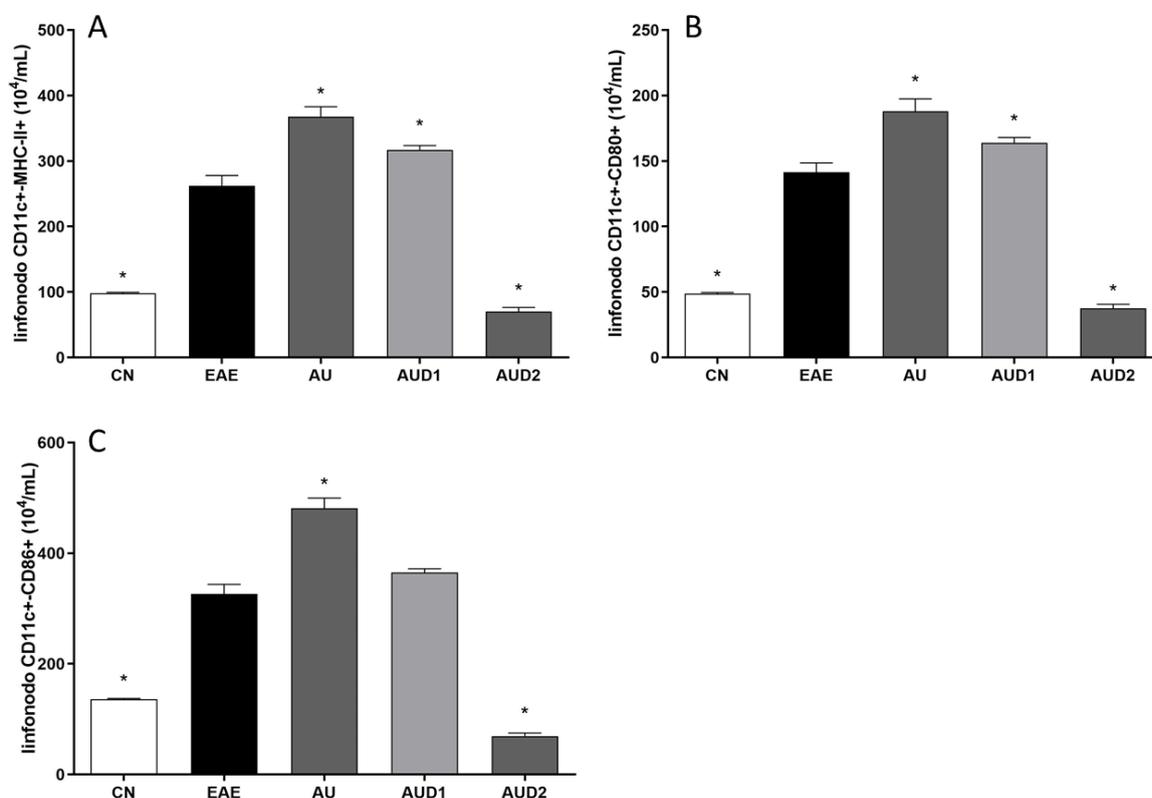
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Número absoluto de células CD4+FOXP3+IL-10+ determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média ± SEM. *= p<0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

6.12 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS AUD1 E AUD2 NA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES EM CÉLULAS DO LINFONODO POR CITOMETRIA DE FLUXO NO 21º DIA APÓS A INDUÇÃO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO DE EAE

Foi realizada a análise do número absoluto das células do linfonodo no 21º dia após a indução. O tratamento com AU foi capaz de aumentar o número de células CD11c+MHCII+, CD11c+CD80+ e CD11c+CD86+, entretanto, o tratamento com AUD2 reduziu o número dessas células quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figuras 27A, 27B, 27C). No grupo tratado com AUD1 ocorreu um aumento do número de células CD11c+MHCII+ e CD11c+CD80+ quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figuras 27A e 27B). Em relação ao número de células CD4+ e CD8+, ocorreu um aumento dessas células no tratamento com AU e uma redução nos tratamentos com AUD1 e AUD2 quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figuras 28A e 28B). Na análise do número de células CD4+IL-17+, foi observado um aumento dessas células no grupo tratado com AU e uma redução nos grupos tratados com AUD1 e AUD2 quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figura 29A). Nos grupos tratados com AU e AUD1 foi observado um aumento no número de células CD4+IFN γ + e no grupo tratado com AUD2 uma redução de células CD4+IFN γ + quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figura 29B). Os tratamentos com AU e AUD1 aumentaram o número de células CD4+CD25+ quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$). Entretanto, o tratamento com AUD2 reduziu o número de células CD4+CD25+ quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figura 29C). Os resultados mostram que os grupos tratados com AU e AUD1 aumentaram o número de células CD4+FOXP3+IL-10+ quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$). Em relação ao tratamento com AUD2 foi observado uma redução de células CD4+FOXP3+IL-10+ quando comparado com o grupo EAE ($p < 0,05$) (Figura 30).

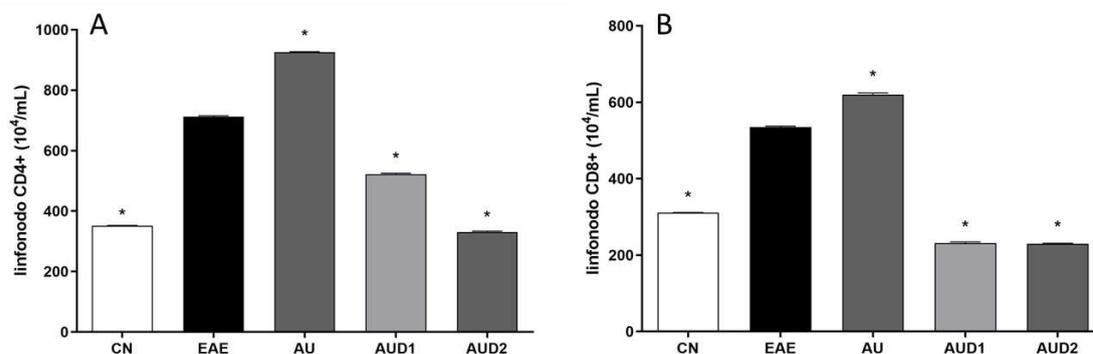
Figura 27 - Número absoluto de células CD11c+MHCII+(A), CD11c+CD80+(B) e CD11c+CD86+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Número absoluto de células CD11c+MHCII+(A), CD11c+CD80+(B) e CD11c+CD86+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do linfonodo de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média ± SEM. *=p<0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

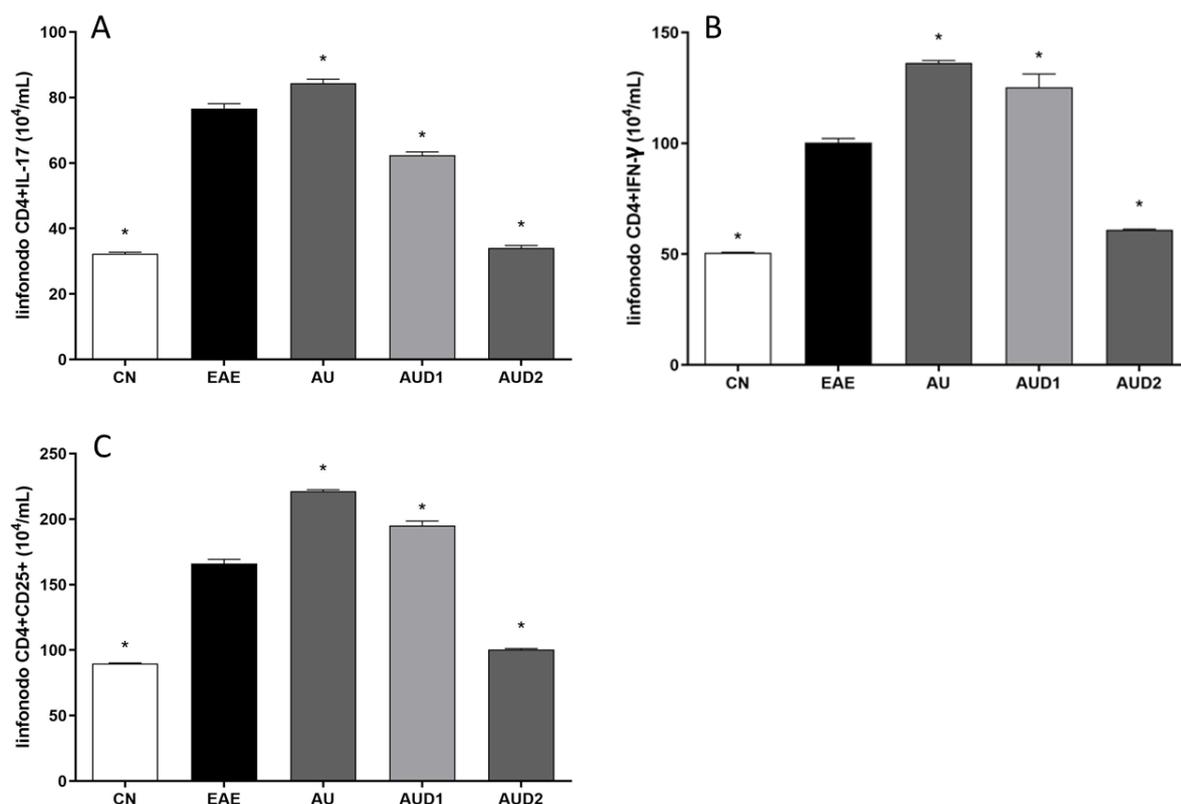
Figura 28 - Número absoluto de células CD4+(A) e CD8+(B) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Número absoluto de células CD4+(A) e CD8+(B) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do linfonodo de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxy-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média ± SEM. *= $p < 0,05$ versus EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

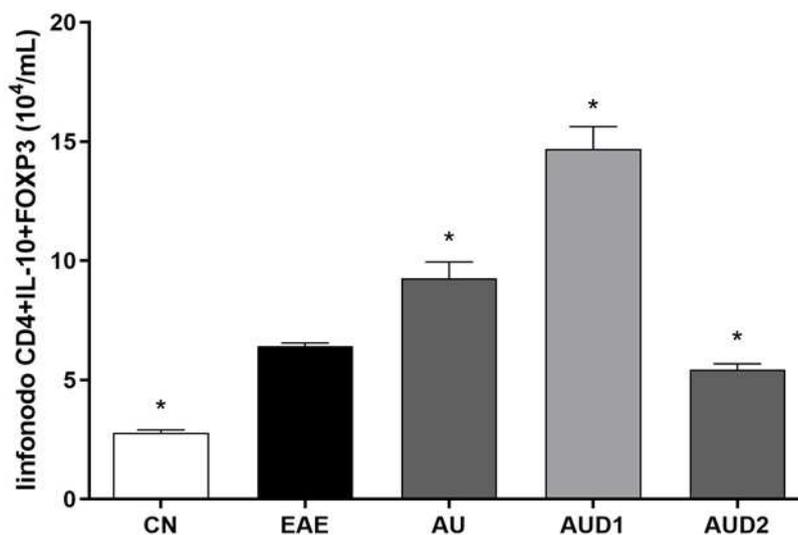
Figura 29 - Número absoluto de células CD4+IL-17+(A), CD4+IFN γ +(B) e CD4+CD25+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais no 21^o dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Número absoluto de células CD4+IL-17+(A), CD4+IFN γ +(B) e CD4+CD25+(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do linfonodo de camundongos C57BL/6 no 21^o dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média \pm SEM. *= p<0,05 versus EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

Figura 30 - Número absoluto de células CD4+FOXP3+IL-10+ determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Número absoluto de células CD4+FOXP3+IL-10+ determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do linfonodo de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a indução com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (n=5 animais/ grupo). CN= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, AU= grupo imunizado tratado com ácido ursólico e AUD1= grupo imunizado tratado com 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila, AUD2= grupo imunizado tratado com 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oato de metila. Cada barra representa a média ± SEM. * = p < 0,05 *versus* EAE. Os resultados foram representativos de três experimentos independentes.

7 DISCUSSÃO

A inflamação aguda é um mecanismo de defesa imediato desencadeado pelos estímulos nocivos que iniciam uma cascata de sinalização, ativando leucócitos, que então produzem e liberam citocinas inflamatórias, dentre elas a IL-6 (KANG. *et al.*; 2019; UCIECHOWSKI; DEMPKE; 2020). A IL-6 atua em células endoteliais ativando o fator de transcrição STAT-3, permitindo a expressão de quimiocinas e aumento de ICAM-1, recrutando os leucócitos para o local do antígeno, contribuindo para o processo inflamatório (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018; HIRANO, 2020). Sabe-se ainda que esta citocina pró inflamatória é a principal indutora de proteínas hepáticas de fase aguda, sendo secretada por neutrófilos, monócitos e macrófagos ativados (BODE *et al.*, 2012; SCHMIDT-ARRAS; ROSE-JOHN, 2016). A IL-6 atua tanto na resposta imune inata, como na resposta imune adaptativa. Na resposta imune inata, a IL-6 é prontamente sintetizada por células mielóides, como macrófagos e células dendríticas, após o reconhecimento de patógenos por meio de receptores TLRs no local da infecção ou lesão tecidual. Na resposta imune adaptativa, a IL-6 desempenha um papel crítico para a ativação das células B, induzindo a formação de plasmócitos, que são células produtoras de anticorpos (KANG *et al.*, 2019). Em combinação com o TGF- β , a IL-6 promove a diferenciação de células T *naive* para células Th17 que são produtoras de citocina pró- inflamatória IL-17 (QIN *et al.*, 2009).

A produção excessiva de IL-6, promove um aumento da relação Th17/Treg resultando na interrupção da tolerância imunológica, contribuindo para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes (GARBERS *et al.*, 2018; KANG *et al.*, 2019). Assim, vários agentes terapêuticos têm sido avaliados como possíveis inibidores de IL-6 e de suas vias de sinalização (GARBERS *et al.*, 2018; KANG *et al.*, 2019).

Em resultados prévios *in vitro* obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, foi observada a atividade inibitória do AU e de seus derivados AUD1 e AUD2 sobre a expressão de NF- κ B (SCHERRER *et al.*, 2019). Com o objetivo de dar continuidade à investigação acerca dos efeitos destes derivados, o presente trabalho inicialmente, avaliou os possíveis efeitos imunomodulatórios de AUD1 e AUD2 em uma inflamação aguda. Para alcançar o objetivo, foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. A carragenina é uma substância que desencadeia uma inflamação aguda, com vasodilatação, edema e migração de células, como neutrófilos, para o local da lesão, assim como aumento de citocinas pró inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1 β (LOPES *et al.*, 2020).

Os resultados obtidos no presente trabalho, mostraram que os camundongos Balb/c dos grupos que receberam os tratamentos com os derivados AUD1 e AUD2, apresentaram uma redução significativa do edema de pata, assim como observado no grupo tratado com a dexametasona. Sugere-se que um dos fatores contribuintes para esta significativa redução do edema de pata foi o decréscimo da concentração da citocina pró-inflamatória IL-6 promovida pelos tratamentos com os derivados AUD1 e AUD2.

Considerando ainda a capacidade do AU de modular a resposta inflamatória *in vitro* e ainda em modelos experimentais, por meio da inibição da produção de mediadores inflamatórios (XU *et al.*, 2011; SAHU *et al.*, 2018; YAMAMOTO *et al.*, 2020; RONG *et al.*, 2022), o presente estudo investigou os possíveis efeitos dos tratamentos dos derivados AUD1 e AUD2, na modulação da resposta imune de uma inflamação crônica utilizando o modelo murino de EAE.

A EAE é usada como um modelo experimental da esclerose múltipla, por desenvolver muitos aspectos clínicos, morfológicos e histológicos em comum com a EM. A neuroinflamação e desmielinização são responsáveis pelos sinais clínicos de incapacidade e progressão da EM e EAE (MCGINLEY *et al.*, 2018; AHARONI *et al.*, 2021; BIRMPILI *et al.*, 2022; HUNTEMANN *et al.*, 2022). Como esperado, no presente trabalho os animais do grupo EAE apresentaram infiltrado de células inflamatórias, desmielinização e sinais clínicos corroborando com os dados previamente descritos na literatura.

Na EAE as células Th1 e Th17 têm a capacidade de orquestrar o influxo de células inflamatórias nas lesões do SNC através da secreção de citocinas pró-inflamatórias (GLATIGNY; BETTELLI, 2018; VAN KAER *et al.*, 2019). As células Th1 são células CD4⁺ produtoras das citocinas pró-inflamatórias tais como, IL-12, IFN- γ e TNF- α . Por sua vez, as células CD4⁺Th17⁺ são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias IL-17, IL-21 e IL-22. Enquanto as citocinas pró-inflamatórias atuam contribuindo para o agravamento da doença, as citocinas anti-inflamatórias atuam suprimindo a resposta imunológica autorreativa (JAHAN-ABAD *et al.*, 2019).

Sabe-se também que as células dendríticas, macrófagos infiltrantes, células B e micróglias residentes do SNC podem expressar a molécula MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 que estão envolvidas na iniciação e progressão da EAE e EM. Em acréscimo, células que expressam CD11c⁺ se apresentam como potentes APCs auxiliando na resposta proliferativa de linfócitos T (DONG; YONG, 2019; JURGA; PALECZNA; KUTER, 2020).

Em conformidade com esses dados, as análises do presente estudo, mostraram um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-12p70, TNF- α e IFN- γ relacionadas ao perfil Th1 e Th17. Concomitantemente, ocorreu um aumento do número de células CD4+, CD8+, CD11+MHC-II+, CD11+CD80+, CD11+CD86+, CD4+, CD8+, CD4+IL-17+ e CD4+IFN γ + no SNC do grupo de animais EAE, o que indica que ocorreu um aumento na apresentação de antígenos, que contribuiu para o aumento da reativação das células perfil Th1 e Th17 no SNC dos animais EAE.

A citocina IL-6 é conhecida por estar envolvida na inflamação do SNC e na patologia de EAE, diretamente através da ativação da micróglia e astrócitos ou indiretamente, promovendo a diferenciação e a expansão das células Th17 (NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018). Em protocolos experimentais utilizando camundongos geneticamente deficientes em IL-6, não foi possível induzir a EAE, mostrando assim, a relevância desta citocina no desenvolvimento da doença (SERADA *et al.*, 2008). No presente trabalho os tratamentos com os derivados AUD1 e AUD2 reduziram o número de células CD4+ produtoras de IL-17 no SNC.

O perfil de célula auxiliar Th1 é produtor de IFN- γ e apresenta um papel fundamental na imunoestimulação e imunomodulação. Sabe-se ainda que, em resposta ao IFN- γ liberado pelos linfócitos Th1, as micróglias aumentam a expressão do MHC II e liberam citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6, IL-23 e o TNF- α (KYRAN *et al.*, 2018). No presente estudo, foi observado que os derivados AUD1 e AUD2 reduziram o número de células CD4+ produtoras de IFN- γ , bem como a produção de citocinas IL-1 β e TNF- α no SNC, sugerindo que ocorreu uma redução no perfil de células produtoras de IFN- γ , possivelmente Th1 no cérebro, reduzindo a ativação das micróglias e consequentemente o processo inflamatório.

As características neuroimunológicas da EAE também têm sido avaliadas pela concentração das citocinas pró-inflamatórias: IL1- β e TNF- α . As citocinas IL1- β e TNF- α liberadas por células T ativadas e macrófagos facilitam o início da reação imune local. Essa reação pode produzir danos no endotélio vascular e aumentar a permeabilidade da BHE e consequentemente facilitar o infiltrado de células no SNC. As citocinas IL1- β e TNF- α também são secretadas por astrócitos e micróglias ativadas, promovendo neurodegeneração e desmielinização no SNC (CHOI *et al.*, 2014; DONG; YONG, 2019). Neste estudo, os tratamentos com os derivados AUD1 e AUD2 atenuaram as concentrações das citocinas IL1- β e TNF- α na medula, o que pode ter contribuído para a redução do número de células CD8+, CD4+, CD4+IFN- γ +, CD4+IL-17+ encontradas SNC.

Resultados obtidos anteriormente por Ellrichmann et al. (2012), permitem ainda relacionar a inibição IL-1 β e TNF- α na medula com a inibição do fator de transcrição NF- κ B. O NF- κ B é um conhecido fator transcricional envolvido no processo inflamatório, sendo responsável por induzir a transcrição de vários genes de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α e IL-1 β . Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, o ácido ursólico e seus derivados AUD1 e AUD2, reduziram a expressão de NF- κ B (SCHERRER *et al.*, 2019).

Entre as citocinas pró-inflamatórias na patogênese da EAE, pode-se destacar a IL-12, denominada IL-12p70, que é uma citocina produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos, com a capacidade de promover a diferenciação de células CD4⁺ em células do perfil Th1, como citado anteriormente. O fator de transcrição Tbet, controla um programa de expressão gênica que resulta na produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2, que possuem características predominantemente pró-inflamatórias (HAMZA; BARNETT; LI, 2010). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que ambos os tratamentos com o AUD1 e AUD2 foram eficientes na redução do número de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ no cérebro, mesmo não reduzindo a citocina IL-12p70. Desta forma, uma possível justificativa é que os tratamentos sejam atuantes na diferenciação periférica, migração e/ou entrada das células para o SNC, embora o microambiente no parênquima cerebral estivesse propício para a atuação do perfil Th1 (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

A IL-10 é uma citocina que modula a imunidade inata e adaptativa, principalmente por exercer efeitos anti-inflamatórios, sendo produzidas por diversas células da resposta imune (TRINCHIERI, 2007; SUN *et al.*, 2021). Entre as células produtoras de IL-10, ressalta-se o papel das células Tregs, caracterizadas pelas CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (DARGAHI *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado a importância da ação da IL-10 no controle da EAE devido ao seu efeito imunorregulador. As células CD4⁺FOXP3⁺ produtoras de IL-10 estão associadas à diminuição dos sinais clínicos na EAE (DAI *et al.*, 2012; BAI *et al.*, 2018). Embora as Tregs estejam associadas na melhora dos sinais clínicos na EAE, o AUD2 promoveu uma redução significativa nos sinais clínicos dos animais tratados, no entanto, inibiu a produção de IL-10 na medula e ainda inibiu o número de células CD4⁺IL-10⁺FOXP3⁺ na periferia e no cérebro, demonstrando assim que o mecanismo de autorregulação para o AUD2 parece não estar relacionado com as células CD4⁺IL-10⁺FOXP3⁺. Já o derivado AUD1 apresentou mecanismos diferentes de regulação na periferia e no SNC. No SNC, o AUD1, não elevou a concentração de IL-10

na medula, e também não aumentou o número de células CD4+IL-10+FOXP3+ no cérebro, sugerindo que no SNC o AUD1 se comporta de maneira similar ao AUD2. Por outro lado, na periferia, o derivado AUD1 aumentou o número de células CD4+IL-10+FOXP3+. Este aumento de células CD4+IL-10+FOXP3+ na periferia pode justificar a redução do número de células CD4+, CD8+ e CD4+ produtoras de IL-17 nos linfonodos pelo o AUD1.

No presente estudo observou-se que o tratamento com o AUD2 foi o que apresentou melhor resultado na inibição dos sinais clínicos da EAE, os resultados demonstram que este derivado atuou nas células apresentadoras, diminuindo o número de células APCs com moléculas coestimulatórias na periferia, sugerindo que esta redução pode ter contribuído na inibição do número de células do perfil Th1 e Th17 encontradas nos linfonodos, assim como no SNC. Os estudos mostram que em EAE e EM as células T autorreativas que escapam à tolerância central no timo, podem entrar nos linfonodos. Neste local as APCs via MHC de classe II e co estimulação de CD80, CD86 e CD11c ativam as células T CD4+ que podem então se diferenciar em Th1 e Th17, entre outros tipos celulares. Essas moléculas coestimulatórias são importantes para a sinapse imunológica entre as APCs e os linfócitos T, não só para a apresentação do antígeno como também na indução do segundo sinal para a produção de citocinas. Estudos tem demonstrado que a inibição dessas moléculas é capaz de suprimir a EAE (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; MILOVANOVIC *et al.*, 2020).

Além das células CD4+, há evidências que as células CD8+ contribuem para o dano tecidual do SNC na EAE e também estão presentes no líquido de pacientes com EM (HUSEBY *et al.*, 2001). Neste contexto, o AUD2 ao reduzir o número de células apresentadoras expressando moléculas coestimulatórias CD80/CD86, pode ter contribuído para a redução do número de células CD8+ observado nos linfonodos e no cérebro. Sabe-se que a ligação de CD28, expressos em células T, com CD80/CD86 expressos em APCs, transduz um sinal co-estimulatório secundário fundamental para completar a ativação de células T CD8+ virgens em efectoras (FINK; HENDRICKS, 2011).

Além da modulação do perfil celular e mediadores inflamatórios, os tratamentos com AUD1 e AUD2 também reduziram a presença de infiltrados inflamatórios e desmielinização na medula espinhal, sugerindo uma relação com a inibição do agravamento dos sinais clínicos. A desmielinização na EAE tal como na EM, é um resultado das lesões inflamatórias no SNC que conduzem para os sinais clínicos (LASSMANN, 2018).

Diante dos resultados apresentados no presente trabalho, sugerem que os

mecanismos de ação destes derivados são diferentes. O derivado AUD2 melhora os sinais clínicos da EAE ao promover a redução das células APCs e suas moléculas coestimulatórias e conseqüentemente a redução da ativação das células CD4+, CD8+ e ainda uma inibição na diferenciação das células CD4+ em perfil Th1 e Th17 nos linfonodos, achados semelhantes ao encontrado por ZHANG *et al.* (2020), utilizando o ácido ursólico como tratamento em um modelo EAE. No SNC, o AUD2 reduziu as células apresentadoras e suas moléculas coestimulatórias, bem como as citocinas próinflamatórias (IL-1 β e TNF- α), contribuindo para a redução da reativação das células Th1/Th17. Por sua vez, o AUD1 apresentou o mesmo mecanismo de ação observado para AUD2 no SNC. Entretanto, na periferia o derivado AUD1 inibiu o número de células CD4+, CD8+ e células CD4+Th17+ e aumentou o número de células reguladoras CD4+IL-10+FOXP3+, indicando uma atuação de Tregs no seu mecanismo de ação, o que não foi observado com o tratamento com o AUD2. Mais estudos são necessários para esclarecimentos destes resultados, no que diz respeito da migração para o SNC.

É importante ainda ressaltar que ambos tratamentos foram capazes de reduzir o número de células CD4+ com perfil Th17 na periferia e no SNC. É conhecido que a inibição das atividades das células Th17 possui implicações significativas no tratamento da EM e de outras doenças relacionadas ao sistema imunológico (TESMER *et al.*, 2008).

8 CONCLUSÃO

No contexto do modelo de inflamação aguda, tanto o AUD1 quanto o AUD2 demonstraram eficácia comparável à dexametasona, um anti-inflamatório amplamente utilizado na prática clínica.

Em conclusão, no modelo EAE, a regulação das células imunológicas na periferia e a redução no número de células pró-inflamatórias no SNC com os tratamentos com AUD1 e AUD2 se correlacionaram com melhores aspectos histológicos no SNC que culminaram com eficácia sobre os parâmetros clínicos apresentados na EAE, sugerindo um potencial terapêutico no tratamento da EM.

REFERÊNCIAS

AHARONI, R. et al. Titration of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) - induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 351, p. 108999, mar. 2021.

AHMAD, S. F. *et al.* Amelioration of adjuvant-induced arthritis by ursolic acid through altered Th1/Th2 cytokine production. **Pharmacological research**, vol. 53, n.3, p. 233-40, março 2006.

ALBERTI, P.; HANDEL, A. E. The contribution of thymic tolerance to central nervous system autoimmunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 43, n. 1, p. 135–157, 27 out. 2020.

AMATYA, N.; GARG, A. V.; GAFFEN, S. L. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 5, p. 310–322, maio 2017.

ANDERTON, H.; WICKS, I. P.; SILKE, J. Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 9, p. 496–513, 1 set. 2020.

ANDLAUER, T. F. M. et al. Novel multiple sclerosis susceptibility loci implicated in epigenetic regulation. **Science Advances**, v. 2, n. 6, 3 jun. 2016.

ANNAMALAI, P.; THANGAM, E. B. Local and Systemic Profiles of Inflammatory Cytokines in Carrageenan-induced Paw Inflammation in Rats. **Immunological Investigations**, v. 46, n. 3, p. 274–283, 14 dez. 2016.

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 491, 7 out. 2014.

ARRAMBIDE, G.; TINTORE, M.; MONTALBAN, X. Oligoclonal bands do not represent dissemination in time in the 2017 revisions to the McDonald criteria. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 25, n. 12, p. 1690–1691, 16 maio 2019.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. **Seminars in neurology**, v. 36, n. 2, p. 103-14, Abr 2016.

BAEK, S. Y. et al. “Ursolic acid ameliorates autoimmune arthritis via suppression of Th17 and B cell differentiation.” **Acta pharmacologica Sinica**, v. 35, n.9, p.1177-87, setembro 2014.

BAI, X.-Y. et al. Tetramethylpyrazine ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating the inflammatory response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 3, p. 1968–1972, set. 2018.

BAR-OR, A.; LI, R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. **The Lancet Neurology**, v. 20, n. 6, p. 470–483, jun. 2021.

BECKER, J. et al Hypovitaminosis D association with disease activity in relapsing remitting multiple sclerosis in Brazil. **J Neurol Sci.** v. 363, p. 236-9, Apr 2016.

BEKKERING, S. et al. Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 667–693, 26 abr. 2021.

BIERHANSL, L. et al. Thinking outside the box: non-canonical targets in multiple sclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 8, p. 578–600, 6 jun. 2022.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, p. 114147, out. 2020.

BIRMPILI, D. et al. The Translatability of Multiple Sclerosis Animal Models for Biomarkers Discovery and Their Clinical Use. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11532, 29 set. 2022.

BODE, J. G. et al. Hepatic acute phase proteins – Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 6-7, p. 496–505, jun. 2012.

BRENNAN, E. P. et al. Lipoxins Regulate the Early Growth Response–1 Network and Reverse Diabetic Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 5, p. 1437–1448, 28 fev. 2018.

BUC, M. New biological agents in the treatment of multiple sclerosis. **Bratislava Medical Journal**, v. 119, n. 04, p. 191–197, 2018.

BURMAN, J. Delaying the inevitable: Are disease modifying drugs for progressive MS worthwhile? **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 54, p. 103134, set. 2021.

CANTO, E.; OKSENBERG, J. R. Multiple sclerosis genetics. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 24, n. 1, p. 75-79, Jan 2018.

CARGNIN, S. T.; GNOATTO, S. B. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties. **Food Chemistry**, v. 220, p. 477–489, abr. 2017.

CELARAIN, N.; TOMAS-ROIG, J. Aberrant DNA methylation profile exacerbates inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis patients. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 21, 14 jan. 2020.

CHAIAMNUAY, S.; ALLISON, J. J.; CURTIS, J. R. Risks versus benefits of cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal antiinflammatory drugs. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, n. 19, p. 1837–1851, 1 out. 2006.

CHEN, C. et al. Oleanolic acid and ursolic acid: therapeutic potential in neurodegenerative diseases, neuropsychiatric diseases and other brain disorders. **Nutritional Neuroscience**, v. 26, n. 5, p. 414-428, 2023.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 14 dez. 2017.

CHEN, T. et al. Structural basis of ligand binding modes at the human formyl peptide receptor 2. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 5 mar. 2020.

CHOI, S. S. et al. Human Astrocytes: Secretome Profiles of Cytokines and Chemokines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e92325, 1 abr. 2014.

CHUN, J. et al. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates experimental colitis in mice. **Life Sciences**, v. 110, n. 1, p. 23–34, ago. 2014.

COETZEE, T.; THOMPSON, A. J. Atlas of MS 2020: Informing global policy change. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1807–1808, 11 nov. 2020.

CONSTANTINESCU, C. S. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, out. 2011.

CONTARINI, G.; GIUSTI, P.; SKAPER, S. D. Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice. **Neurotrophic Factors**, p. 353–360, 9 dez. 2017.

CORREALE, J.; FAREZ, M. F. Smoking worsens multiple sclerosis prognosis: two different pathways are involved. **Journal of Neuroimmunology**, v. 281, p. 23-34, abr. 2015.

CRONIN, S. J. F. et al. The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer. **Nature**, v. 563, n. 7732, p. 564–568, nov. 2018.

CUTOLO, M. et al. The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p.867260, 19 maio 2022.

DAI, H. et al. Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Bowman–Birk inhibitor. **Journal of Neuroimmunology**, v. 245, n. 1-2, p. 1–7, abr. 2012.

DARGAHI, N. et al. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. **Brain sciences**, v. 7, n. 7, p. 78, 2017.

DE PAULA, M.L. et al. Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1291-1297, 2008.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 7 ago. 2015.

DONG, Y.; YONG, V. W. When encephalitogenic T cells collaborate with microglia in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 12, p. 704–717, 16 set. 2019.

ELLRICHMANN, G. et al. Constitutive activity of NF-kappa B in myeloid cells drives pathogenicity of monocytes and macrophages during autoimmune neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 15, 20 jan. 2012.

FAN, N.-W. et al. Autoreactive memory Th17 cells are principally derived from T-bet+ROR γ t+ Th17/1 effectors. **Journal of Autoimmunity**, v. 129, p. 102816, maio 2022.

FERRE, L. et al Basal vitamin D levels and disease activity in multiple sclerosis patients treated with fingolimod. **Neurological Sciences**, v. 39, n. 8, p. 1467-1470, ago. 2018.

FILEP, J. G. Targeting Neutrophils for Promoting the Resolution of Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 866747, 16 mar. 2022.

FILIPPI, M.; ROCCA, M. A. Multiple Sclerosis. **White Matter Diseases**, p. 1–35, 2020.

FINK, P. J.; HENDRICKS, D. W. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 544–549, 22 jul. 2011.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551–567, 29 mar. 2016.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, dez. 2019.

GAGLIANI, N. et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 221–225, 9 jul. 2015.

GARBERS, C. et al. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 6, p. 395–412, 4 maio 2018.

GAUBLomme, J.T. et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1400–1412, dez. 2015.

GELADARIS, A.; HÄUSLER, D.; WEBER, M. S. Microglia: The Missing Link to Decipher and Therapeutically Control MS Progression? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3461, 27 mar. 2021.

GHOLAMZAD, M. *et al.* A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. **Inflammation Research**, v. 68, n. 1, p. 25–38, 3 set. 2018.

GLATIGNY, S.; BETTELLI, E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 11, p. a028977, 8 jan. 2018.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of standardized dichloromethane extract of *Salvia connivens* on macrophages stimulated by LPS. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1467–1472, 27 mar. 2017.

- GUDOITYTE, E. et al. Ursolic and Oleanolic Acids: Plant Metabolites with Neuroprotective Potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4599, 27 abr. 2021.
- GUNAYDIN, C.; BILGE, S. S. Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs at the Molecular Level. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 116-121, 29 jun. 2018.
- GUO, Y.-X. et al. Role of Plant-Derived Natural Compounds in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Review of the Treatment Potential and Development Strategy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p.639651, 28 jun. 2021.
- HAMZA, T.; BARNETT, J. B.; LI, B. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 3, p. 789–806, 26 fev. 2010.
- HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 821-847, 27 jan. 2014.
- HARTUNG, D. M. Health economics of disease-modifying therapy for multiple sclerosis in the United States. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 14, p. 175628642098703, jan. 2021.
- HARTUNG, H.-P. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: revisions of the McDonald criteria 2017 - continuity and change. **Current opinion in neurology**, v. 32, n. 3, p. 327–337, 2019.
- HASSELMANN, J. P. C. et al. Consistent induction of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice for the longitudinal study of pathology and repair. **Journal of neuroscience methods**, v. 284, p. 71–84, 1 jun. 2017.
- HAUSER, S. L.; CREE, B. A. C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 12, p. 1380-1390.e2, dez. 2020.
- HIRANO, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **International Immunology**, v. 33, n. 3, p. 127–148, 18 dez. 2020.
- HUDAYA, S.; HARDIAN, H. Anti-inflammatory effect of celery squeezed juice on carrageenan induced rat paw edema. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.
- HUNTEMANN, N. et al. An optimized and validated protocol for inducing chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6J mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 367, p. 109443, fev. 2022.
- HUSEBY, E. S. et al. A Pathogenic Role for Myelin-Specific Cd8+ T Cells in a Model for Multiple Sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 5, p. 669–676, 3 set. 2001.

- HUSSMAN, J. P. et al. GWAS analysis implicates NF- κ B-mediated induction of inflammatory T cells in multiple sclerosis. **Genes & Immunity**, v. 17, n. 5, p. 305–312, 1 jul. 2016.
- JAHAN-ABAD, A. J. et al. Serum pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neuropathology**, v. 40, n. 1, p. 84-92, 10 nov. 2019.
- JAKIMOVSKI, D. et al. Lifestyle-based modifiable risk factors in multiple sclerosis: review of experimental and clinical findings. **Neurodegenerative Disease Management**, v. 9, n. 3, p. 149–172, jun. 2019.
- JURGA, A. M.; PALECZNA, M.; KUTER, K. Z. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, 6 ago. 2020.
- KAMALI, A. N. et al. A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. **Molecular Immunology**, v. 105, p. 107–115, 1 jan. 2019.
- KANG, S. et al. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 1007–1023, abr. 2019.
- KASHYAP, D.; TULI, H. S.; SHARMA, A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. **Life Sciences**, v. 146, p. 201–213, fev. 2016.
- KATZ, S.; ZSIROS, V.; KISS, A. L. Under inflammatory stimuli mesenteric mesothelial cells transdifferentiate into macrophages and produce pro-inflammatory cytokine IL-6. **Inflammation Research**, v. 68, n. 7, p. 525–528, 21 maio 2019.
- KIPP, M. et al. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. **Brain pathology**, v. 27, n. 2, p. 123–137, 2017.
- KISS, A. L. Inflammation in Focus: The Beginning and the End. **Pathology and Oncology Research**, v. 27, 4 jan. 2022.
- KYRAN, E. L. et al. Multiple pathological mechanisms contribute to hippocampal damage in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. **NeuroReport**, v. 29, n. 1, p. 19–24, 3 jan. 2018.
- KOBELT, G. *et al.* Burden and cost of multiple sclerosis in Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0208837, 23 jan. 2019.
- LAEV, S. S.; SALAKHUTDINOV, N. F. Anti-arthritis agents: Progress and potential. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 3059–3080, jul. 2015.
- LASSMANN, H. Multiple Sclerosis Pathology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 3, p. a028936, 22 jan. 2018.
- LASSMANN, H. Targets of therapy in progressive MS. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 23, n. 12, p. 1593–1599, out. 2017.

- LEBRUN-FRENAY, C. *et al.* Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event. **Annals of Neurology**, v. 88, n. 2, p. 407–417, 29 jun. 2020.
- LI, P.; ZHENG, Y.; CHEN, X. Drugs for Autoimmune Inflammatory Diseases: From Small Molecule Compounds to Anti-TNF Biologics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 12 jul. 2017.
- LI, Y. *et al.* Cell intrinsic role of NF- κ B-inducing kinase in regulating T cell-mediated immune and autoimmune responses. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, fev. 2016.
- LIMA, K. M. *et al.* The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 33, p. 13758–13773, ago. 2017.
- LOPES, A. H. *et al.* Molecular basis of carrageenan-induced cytokines production in macrophages. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, 7 set. 2020.
- LUBLIN, F. D. *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. **Neurology**, v. 83, n. 3, p. 278–286, 28 maio 2014.
- MAIA DINIZ, I. *et al.* The long-term costs for treating multiple sclerosis in a 16-year retrospective cohort study in Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0199446, 21 jun. 2018.
- MANSOURI, M. T. *et al.* A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 292, 2015.
- MASVEKAR, R. *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers link toxic astrogliosis and microglial activation to multiple sclerosis severity. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 28, p. 34–43, fev. 2019.
- MCDONALD, W. I. *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 50, n. 1, p. 121–127, 2001.
- MCDONOUGH, A. K.; CURTIS, J. R.; SAAG, K. G. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 20, n. 2, p. 131–137, mar. 2008.
- MCGINLEY, A. M. *et al.* Th17 cells, $\gamma\delta$ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 87, p. 97–108, fev. 2018.
- MEEK, I. L.; VAN DE LAAR, M. A. F. J.; VONKEMAN, H. E. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 7, p. 2146–2162, 7 jul. 2010.
- MEIER, F. M. *et al.* Current immunotherapy in rheumatoid arthritis. **Immunotherapy**, v. 5, n. 9, p. 955–974, set. 2013.

MEIZLISH, M. L. et al. Tissue Homeostasis and Inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 557–581, 26 abr. 2021.

MILOVANOVIC, J. et al. Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 3 jun. 2020.

MOIOLA, L.; ROMMER, P. S.; ZETTL, U. K. Prevention and management of adverse effects of disease modifying treatments in multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 33, n. 3, p. 286–294, jun. 2020.

MONACO, C. et al. Anti-TNF therapy: past, present and future. **International Immunology**, v. 27, n. 1, p. 55–62, jan. 2015.

MORIN, C.; FARDET, L. Systemic glucocorticoid therapy: risk factors for reported adverse events and beliefs about the drug. A cross-sectional online survey of 820 patients. **Clinical Rheumatology**, v. 34, n. 12, p. 2119–2126, 9 maio 2015.

MOUTSIANAS, L *et al.* Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. **Nature Genetics**, v. 47, n. 10, p. 1107–1113, 7 set. 2015.

NAGHAVI, M. Global, regional, and national burden of suicide mortality 1990 to 2016: systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **BMJ**, p. 194, 6 fev. 2019.

NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3528, 9 nov. 2018.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation. **Nature immunology**, v. 18, n. 8, p. 826–831, 19 jul. 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, 12 mar. 2020.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a006049–a006049, 31 jan. 2012.

NGUYEN, H. N. et al. Ursolic Acid and Related Analogues: Triterpenoids with Broad Health Benefits. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1161, 21 jul. 2021.

NOURBAKHS, B.; MOWRY, E. M. Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 3, p. 596–610, jun. 2019.

NOVO, A. M.; BATISTA, S. Multiple Sclerosis: Implications of Obesity in Neuroinflammation. **Adv Neurobiol.** v. 19, p. 191-210, 2017.

- NYATI, K. K. et al. TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 5, p. 2687–2703, 17 mar. 2017.
- PANT, A. B. et al. Alteration of CD39⁺Foxp3⁺ CD4 T cell and cytokine levels in EAE/MS following anti-CD52 treatment. **Journal of Neuroimmunology**, v. 303, p. 22–30, fev. 2017.
- PARK, Y. et al. Anti-inflammatory effects of essential oils extracted from *Chamaecyparis obtusa* on murine models of inflammation and RAW 264.7 cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 4, p. 3335–3341, 18 fev. 2016.
- PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, fev. 2016.
- PATRIOTA, L. L S. et al. Inhibition of Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice by the Microgramma vacciniifolia Frond Lectin (MvFL). **Polymers**, v. 14, n. 8, p. 1609, 15 abr. 2022.
- PERRETTI, M. et al. Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 11, p. 737–755, nov. 2015.
- QIN, H. et al. TGF- β Promotes Th17 Cell Development through Inhibition of SOCS3. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 97–105, 1 jul. 2009.
- RAI, S. N. et al. Anti-inflammatory Activity of Ursolic Acid in MPTP-Induced Parkinsonian Mouse Model. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 3, p. 452–462, 23 abr. 2019.
- RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 42, n. 1, p. 15–31, fev. 2016.
- RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, A. M. et al. Effect of Ursolic Acid on Metabolic Syndrome, Insulin Sensitivity, and Inflammation. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 9, p. 882–886, set. 2017.
- RAMOS-HRYB, A. B. et al. Therapeutic Potential of Ursolic Acid to Manage Neurodegenerative and Psychiatric Diseases. **CNS Drugs**, v. 31, n. 12, p. 1029–1041, 2 nov. 2017.
- REDFERN, J. S. Immunopathophysiologic basis of multiple sclerosis and implications for therapy—a narrative review. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 9, n. 6, p. 263–271, 21 dez. 2021.
- REICH, D. S.; LUCCHINETTI, C. F.; CALABRESI, P. A. Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 2, p. 169–180, 11 jan. 2018.
- RENDA, G.; GÖKKAYA, İ.; ŞÖHRETOĞLU, D. Immunomodulatory properties of triterpenes. **Phytochemistry Reviews**, p. 1–27, 18 nov. 2021.

RODA, G. et al. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 7, n. 1, p. e135, jan. 2016.

RONCHI, F. et al. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 β production by myeloid cells. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 18 maio 2016.

RONG, Z.-J. et al. Ursolic Acid Ameliorates Spinal Cord Injury in Mice by Regulating Gut Microbiota and Metabolic Changes. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, 4 maio 2022.

RUSSELL, D. G.; HUANG, L.; VANDERVEN, B. C. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 5, p. 291–304, 24 jan. 2019.

SAHU, S. et al. The human natural killer-1 (HNK-1) glycan mimetic ursolic acid promotes functional recovery after spinal cord injury in mouse. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 55, p. 219–228, maio 2018.

SALAU, V. F. et al. Modulatory effect of ursolic acid on neurodegenerative activities in oxidative brain injury: An *ex vivo* study. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 2, 23 dez. 2020.

SALAZAR, I. L. et al. Posttranslational modifications of proteins are key features in the identification of CSF biomarkers of multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, 8 fev. 2022.

SCHERRER, E. C. *et al.* Ursolic Acid Derivatives Induced Apoptosis and Reduces the NF- κ B in Human Lung Adenocarcinoma Cells. **Journal of Cancer Therapy**, v. 10, n. 10, p. 863–876, 2019.

SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1403–1415, jun. 2016.

SEO, D. Y. et al. Ursolic acid in health and disease. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 235–248, 1 maio 2018.

SERADA, S. et al. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9041–9046, jul. 2008.

SERHAN, C. N. et al. The Atlas of Inflammation Resolution (AIR). **Molecular Aspects of Medicine**, v. 74, p. 100894, ago. 2020.

SIMPSON, S. et al. Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 90, n. 11, p. 1193–1200, 19 jun. 2019.

ŚLADOWSKA, K. et al. Comparative safety of high-efficacy disease-modifying therapies in relapsing–remitting multiple sclerosis: a systematic review and network meta-analysis. **Neurological Sciences**, v. 43, n.9, p.5479-550017, jun. 2022.

SOLLID, L. M. Epstein-Barr virus as a driver of multiple sclerosis. **Science Immunology**, v. 7, n. 70, abr. 2022.

SOLOMON, A. J. Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 3, p. 611–635, jun. 2019.

SRIUTTHA, P.; SIRICHANCHUEN, B.; PERMSUWAN, U. Hepatotoxicity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **International Journal of Hepatology**, v. 2018, 15 jan. 2018.

SUN, H. et al. IL-10-Producing ILCs: Molecular Mechanisms and Disease Relevance. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 29 mar. 2021.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. a016295–a016295, 4 set. 2014.

TESMER, L. A. et al. Th17 cells in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 87–113, jun. 2008.

THOMPSON, A. J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 2, p. 162–173, fev. 2018b.

THOMPSON, A. J. et al. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1622–1636, abr. 2018a.

TIMMERMANS, S.; SOUFFRIAUX, J.; LIBERT, C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1545, 4 jul. 2019.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 239–243, 12 fev. 2007.

TRIPATHI, P.; ALSHAHRANI, S. Mitigation of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and markers of apoptosis by ursolic acid against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 40, n. 12_suppl, p. S397–S405, 26 set. 2021.

UCIECHOWSKI, P.; DEMPKE, W. C. M. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. **Oncology**, v. 98, n. 3, p. 131–137, 2020.

VAN KAER, L. et al. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 16, n. 6, p. 531–539, 15 mar. 2019.

WALTON, C. et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1816–1821, 11 nov. 2020.

WANG, C. et al. Ursolic acid protects chondrocytes, exhibits anti-inflammatory properties via regulation of the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway and ameliorates osteoarthritis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110568, out. 2020.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 614, 2014.

WANG, Y. et al. Ursolic Acid Ameliorates Inflammation in Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury Possibly via High Mobility Group Box 1/Toll-Like Receptor 4/NF κ B Pathway. **Frontiers in Neurology**, v. 9, p.253, 18 maio 2018.

WATANABE, S. et al. The role of macrophages in the resolution of inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 7, p. 2619–2628, 1 jul. 2019.

WAUBANT, E. et al. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 6, n. 9, p. 1905–1922, 7 ago. 2019.

WU, C. et al. SGK1 Governs the Reciprocal Development of Th17 and Regulatory T Cells. **Cell Reports**, v. 22, n. 3, p. 653–665, jan. 2018.

XU, T. et al. Ursolic Acid Suppresses Interleukin-17 (IL-17) Production by Selectively Antagonizing the Function of ROR γ t Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 26, p. 22707–22710, 1 jul. 2011.

XU, H. et al. Ursolic acid inhibits Th17 cell differentiation via STAT3/ROR γ t pathway and suppresses Schwann cell-mediated Th17 cell migration by reducing CXCL9/10 expression. **Innate Immunity**, v. 28, n. 5, p. 155-163, 12 maio 2022.

YAMAMOTO, S. et al. Ursolic acid treatment suppresses cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction via upregulation of IGF-1. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 144, n. 3, p. 119–122, nov. 2020.

YANG, J. H. et al. Therapeutic Advances in Multiple Sclerosis. **Frontiers in Neurology**, v. 13, 3 jun. 2022.

ZETTERBERG, H. Fluid biomarkers for microglial activation and axonal injury in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 136, p. 15–17, 25 out. 2017.

ZHANG, H. et al. Matrine: A Promising Natural Product With Various Pharmacological Activities. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 7 maio 2020.

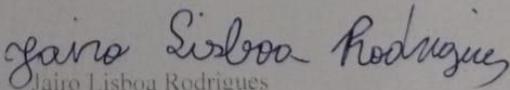
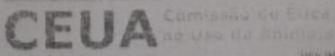
ZHANG, T. et al. Ursolic acid alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage by suppressing TLR4-mediated inflammatory pathway. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 585–591, dez. 2014.

ZHANG, Y. et al. A dual effect of ursolic acid to the treatment of multiple sclerosis through both immunomodulation and direct remyelination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 16, p. 9082–9093, 6 abr. 2020.

ZRZAVY, T. et al. Loss of “homeostatic” microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. **Brain: a journal of neurology**, v. 140, n. 7, p. 1900–1913, 2017.

ZSIROS, V.; KISS, A. L. Cellular and molecular events of inflammation induced transdifferentiation (EMT) and regeneration (MET) in mesenteric mesothelial cells. **Inflammation Research**, v. 69, n. 12, p. 1173–1179, 12 set. 2020.

ANEXO A - Protocolo nº 03-2018R

	<small>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	
CERTIFICADO		
Teófilo Otoni, 1º de março de 2019.		
<p>Certificamos que a proposta intitulada " <i>AVALIÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE 3β-ACETONURS-12-EN-28-OATO DE METILA EM MODELO INFLAMATÓRIO DE EDEMA DE PATA</i>", registrada com o nº 03-2018 R, sob a responsabilidade de Caio César de Souza Alves - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em 13ª Reunião Ordinária, no dia 28 de janeiro de 2019.</p>		
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	01/03/2019 a 28/02/2022	
Espécie linhagem/raça	Camundongo isogênico / Balb/c	
Nº de animais	90	
Peso/Idade	18g / 3 a 4 semanas	
Sexo	Fêmeas	
Origem	CEBIO-ICB-UFMG	
<p><i>Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.</i></p> <p><i>Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa 1, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.</i></p>		
 Jairo Lisboa Rodrigues <small>Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFVJM</small>		
<small>Campus MUCURI Comissão de Ética no Uso de Animais - UFVJM Prédio do ICB - sala 16 - Rua do Cruzeiro - s/n - Jardim São Paulo - Teófilo Otoni - MG - CEP 39802-030 - Telefone: +55 (31) 3529-2700</small>		 <small>CEUA Comissão de Ética no uso de Animais</small>

ANEXO B - Protocolo nº04-2019R



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Teófilo Otoni, 28 de agosto de 2019.

A proposta referente ao

Protocolo nº: 04-2019 R
Intitulado: "AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DE TLR E NLRP3 PELO ÁCIDO URSÓLICO E SEU DERIVADO 3β-HIDROXI-URS-12-EN-28-OATO DE METILA NA ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL"
Pesquisador (a) responsável: Prof. Caio César de Souza Alves
Universidade/Faculdade/Departamento UFVJM / FAMMUC

Foi **aprovado** pela coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFVJM em 28 de Agosto de 2019.

Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.

Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.


Sarah Alves Auharek

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFVJM

Campus do Mucuri
Comissão de Ética no Uso de Animais/UFVJM
Prédio do KET, sala 217 – Rundo Cruzeiro, 91 – Jardim
São Paulo – Teófilo Otoni/MG – CEP 39803-371
Telefone: +55 (33) 3529-2700

CEUA Comissão de Ética
no Uso de Animais

ANEXO C - Publicação de artigo



<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230036>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 34, No. 9, 1250-1261, 2023
©2023 Sociedade Brasileira de Química

Article

Ursolic Acid Derivatives Down Regulate Inflammatory Mediators

Elaine C. Scherrer,^a Ydya M. Valadares,^a Caio C. S. Alves,^{a,b} Alessandra P. Carli,^b
Bárbara G. R. Fernandes,^a Paloma E. Carvalho,^a Karla A. Ramos,^b Maiara R. Salvador,^a
Jeferson G. da Silva,^a Fernando S. Silva,^a Ângelo M. L. Denadai^{*a} and
Sandra B. R. Castro^b

^aInstituto de Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora,
35010-180 Governador Valadares-MG, Brazil

^bFaculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
39803-371 Teófilo Otoni-MG, Brazil

Ursolic acid (UA) is being investigated due to its anti-inflammatory potential, and structural modifications can enhance its biological activities. The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of the ursolic acid derivatives (UAD) in macrophages and in the carrageenan-induced paw edema model. RAW264.7 cells were cultured in the presence or absence of UA or UAD (1-18). Nitric oxide (NO), nuclear factor kappa B (NF-κB), tumor necrosis factor (TNF), and cellular viability were measured. 30 min before the carrageenan-induced paw edema, the UAD1 and UAD2 (200 mg kg⁻¹) were administered intraperitoneally. The results showed that UAD2-4, UAD7, UAD9-11 had half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) greater than 90 μM and were able to reduce NO, NF-κB and TNF production. Moreover, UAD1 and UAD2 reduced paw edema and IL-6 production. In conclusion, the results obtained demonstrated a variation in the response between the derivatives due to the chemical modifications, showing potential to reduce the inflammatory mediators, deserving further investigations.

Keywords: ursolic acid, macrophage, carrageenan, inflammation

Introduction

The inflammation processes are associated with the development of several diseases, acute or chronic, many of them of unclear origin, such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and Crohn's disease.^{1,2} The activation of macrophages is related to the production of inflammatory cytokine and transcription factor expression, such as tumor necrosis factor (TNF) and nuclear factor kappa B (NF-κB), respectively, playing a major role in the establishment of the inflammation.

The cytokines are involved in the activation of endothelial cells and leukocyte infiltration.³ The TNF is a pro-inflammatory cytokine that has several functions, such as inducing the production of other cytokines and lipid mediators of inflammation, proliferation, cell differentiation and apoptosis.⁴ Although the macrophage lineage cells are the main source of TNF, in inflammatory

diseases, it can be produced by a wide variety of cells including neutrophils, fibroblasts and endothelial cells.⁵

The transcription factor NF-κB stands out, which plays a crucial role in the initiation and amplification of inflammation. NF-κB consists of a protein assembly located in the cytoplasm of cells and its activity is controlled by a family of inhibitor proteins, denominated IκB, which bind to the NF-κB dimer, promoting its inhibition. This factor regulates the expression of several genes that code inducible nitric oxide synthase (iNOs), cyclooxygenase-2 (COX-2), TNF-α, interleukin-1-beta (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6), which are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases.⁶⁻⁸

Nitric oxide (NO) is a powerful inflammatory mediator, produced by macrophages and is involved in the regulation of several physiological processes. NO can be generated in excess during the host's response against damage caused by pathogens or other substances, contributing to the pathogenesis of various inflammatory disorders including tissue damage, septic shock, and rheumatoid arthritis.^{9,10} Therefore, lipopolysaccharide (LPS)-induced

*e-mail: angelomld@gmail.com

Editor handled this article: Brenno A. D. Neto

NO production may reflect the degree of inflammation. The inhibition of NO production may demonstrate the ability of a substance to act as possible anti-inflammatory agent, although other mediators needed to be evaluated.^{10,11}

Macrophages, when sensing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by their pattern recognition receptors (PRRs), including Toll-like receptors (TLRs), induce the synthesis of endogenous pyrogenic cytokines, among them interleukin 6 (IL-6). IL-6 constitutes an important inflammatory marker secreted by macrophages in response to pathogen invasion during acute inflammation.^{12,13} Thus, IL-6 has been considered as an important mediator of fever and the acute phase response.^{14,15}

The up-regulation of these inflammatory mediators, produced by the defense, is related to signs and symptoms, such as pain, fever, edema and, sometimes, irreversible tissue damage.^{16,17} Thence, the down-modulation of the inflammatory mediators can be valuable to prevent and control the development of inflammatory diseases.^{1,2,18} In this context, a disordered and excessive production of pro-inflammatory mediators may be related to the pathogenesis of several diseases and, therefore, these mediators are possible targets of therapeutic substances.¹⁹

The inhibition of inflammatory mediators and the immune response regulation, through immunosuppression activity, has been shown as a result of the treatment with ursolic acid (UA).²⁰⁻²⁴ Among the different mechanisms of action of UA, it is possible to highlight its inhibitory action on the expression of NF- κ B.^{25,26}

Taking into consideration the promising activity of UA, the aim of this study was to synthesize ursolic acid derivatives (UAD) and to evaluate the improvement in its biological activity. The chemical modifications in the UA structure, create semisynthetic derivatives that demonstrated enhanced cytotoxic activity against tumor cell lines.²⁷ In a continuation of the work of Scherer *et al.*,²⁷ this study evaluated the immunomodulatory effect of the UAD in macrophage response and in carrageenan-induced paw edema model.

Experimental

Reagents

Ursolic acid was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). The reagents and the solvents were used directly from the manufacturers. Tetramethylsilane (TMS) and CH₃I (Sigma-Aldrich), acetone, EtOAc, *t*-BuOOH, *n*-hexane, CH₂Cl₂, anhydrous diethyl ether, acetic anhydride and tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany); K₂CO₃, NaHCO₃, NaClO₂, Na₂SO₄, LiAlH₄,

BF₃-Et₂O, NaCl and pyridine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were employed to obtain ursolic acid derivatives. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Gibco, Grand Island, USA); RPMI-1640 (Lonza, Basel, Switzerland); bovine serum albumin (BSA), L-glutamine, streptomycin-penicillin, sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride, dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), fetal bovine serum, H₃PO₄, carrageenan, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), benzethonium chloride, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and aprotinin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); and IL-6, TNF and NF- κ B (PS529)-PE 558423 (BD, Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) were used for the biological assays. All the other materials and solvents were of analytical reagent grade and used as received.

Spectral data

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded in CDCl₃ on an AC200 (Bruker Corporation, Billerica, USA) at 200 MHz for ¹H and 50 MHz for ¹³C, using TMS as internal reference for both nuclei. For each peak, chemical shift values are expressed in parts *per* million, followed by multiplicity, relative peak integration (when appropriate) and coupling constants (*J*) in hertz. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a QSTAR XL spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The spectra in the infrared (IR) were obtained in Spectrum One apparatus (PerkinElmer, Wellesley, USA) coupled to the diffuse reflectance accessory (ATR). The specific rotational power values [α]_D²⁵ were measured on a 241 polarimeter (PerkinElmer, Wellesley, USA) at 20 °C. Column chromatography was performed on Silica Gel 60 (230-400 mesh, Merck, Darmstadt, Germany), whereas thin-layer chromatography was carried out on Silica Gel 60 F254 plates (0.25 mm thick, Merck, Darmstadt, Germany). Solvents and reagents were used directly from the manufacturer or purified by standard procedures when required.

Urs-12-ene-3 β ,28-diol (UAD9)

The ursolic acid (60 mg, 0.13 mmol) was reduced with LiAlH₄ (90 mg, 2.37 mmol) in diethyl ether, at room temperature for 20 h. At the end of this period, the excess LiAlH₄ was consumed with a drop of wet ether and then with a drop of water. The reaction mixture was extracted with saturated NaCl solution; the organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solvent eliminated in a rotary evaporator to afford the white solid UAD9 (50 mg, 86.5% yield). FTIR (ATR) ν_{max} / cm⁻¹ 3642 (O-H), 2921 (C-H), 1045 (C-O);

$[\alpha]_D^{25} +71.10$ (*c* 1.00, CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.13 (t, 1H, *J* 3.6, H12), 3.54 (d, 1H, *J* 10.9 Hz, H28a), 3.20 (d, 1H, *J* 10.9 Hz, H28b), 3.18 (m, 1H, H3), 1.91 (dd, 1H, *J* 3.8, 8.8 Hz, H18), 1.10 (s, 3H, CH₃), 1.00 (s, 3H, CH₃), 0.99 (s, 3H, CH₃), 0.95 (s, 3H, CH₃), 0.93 (s, 3H, CH₃), 0.82 (s, 3H, CH₃), 0.79 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 138.77 (C13), 125.06 (C12), 79.04 (C3), 69.93 (C28), 55.19 (C5), 54.05 (C18), 47.70 (C9), 42.08 (C14), 40.06 (C8), 39.39 (C20), 39.39 (C19), 38.81 (C1), 38.03 (C4), 36.90 (C10), 36.90 (C17), 35.24 (C22), 32.85 (C7), 30.68 (C21), 28.18 (C23), 27.27 (C15), 26.05 (C2), 26.05 (C27), 23.33 (C11), 23.33 (C16), 21.39 (C30), 18.37 (C6), 17.42 (C29), 16.83 (C26), 15.69 (C25), 15.69 (C24); HRMS *m/z*, calcd. for C₃₀H₅₀O₂Na: 465.7136, found: 465.3730.

Methyl 3-oxours-12-en-28-oate (UAD10)

Oxidation of the ursolic acid methyl ester UAD1 (500 mg, 1.06 mmol) was carried out with pyridinium dichromate (PDC) (716 mg, 3.3 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ at room temperature under constant stirring for 3 h. The crude reaction product was chromatographed over silica gel (eluent *n*-hexane/EtOAc 8:2) to afford UAD10 (371.9 mg, 74.7% yield). FTIR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2978 (C-H), 1726 (C=O), 1706 (C=O), 1241 (C-O); $[\alpha]_D^{25} +89.20$ (*c* 1.00, CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.26 (t, 1H, *J* 3.4, H12), 3.60 (s, 3H, COOCH₃), 2.23 (d, 1H, *J* 11.0 Hz, H18), 2.05 (s, 3H, COOCH₃), 1.07 (s, 3H, CH₃), 1.03 (s, 3H, CH₃), 0.94 (s, 3H, CH₃), 0.94 (d, 3H, *J* 6.1 Hz, CH₃), 0.85 (d, 3H, *J* 6.2 Hz, CH₃), 0.78 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 217.75 (C3), 178.02 (C28), 138.29 (C13), 125.35 (C12), 55.26 (C5), 52.95 (C18), 51.49 (COOCH₃), 48.14 (C17), 47.41 (C4), 46.78 (C9), 42.15 (C14), 39.47 (C8), 38.47 (C10), 39.32 (C1), 39.06 (C19), 38.88 (C20), 36.64 (C22), 34.21 (C2), 32.52 (C7), 30.68 (C21), 28.04 (C15), 26.57 (C23), 24.22 (C16), 23.48 (C27), 23.48 (C11), 21.53 (C24), 21.20 (C30), 19.62 (C6), 17.09 (C29), 16.90 (C26), 15.21 (C25); HRMS *m/z*, calcd. for C₃₁H₄₈O₃Na: 491.7082, found: 491.3449.

Methyl 3,11-dioxours-12-en-28-oate (UAD11)

The derivative UAD10 (100 mg, 0.21 mmol) was submitted to oxidation with NaClO₂/*t*-BuOOH for 12 h. After 12 h of reaction, aqueous solution was added of 10% Na₂SO₃ and extracted with EtOAc. The organic phase was washed successively with saturated aqueous NaHCO₃ solution and water, dried on anhydrous Na₂SO₄ and the solvent was removed in a rotary evaporator to give the white solid UAD11 (91 mg, 88.4% yield). FTIR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2928 (C-H), 1726 (C=O), 1658 (C=O), 1199 (C-O); $[\alpha]_D^{25} +57.10$ (*c* 1.00, CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.61 (s, 1H, H12), 3.60 (s, 3H, COOCH₃), 2.37 (s, 1H,

H9), 1.27 (s, 3H, CH₃), 1.25 (s, 3H, CH₃), 1.24 (d, 3H, CH₃), 1.22 (d, 3H, *J* 6.2 Hz, CH₃), 1.05 (d, 3H, *J* 7.1 Hz, CH₃), 0.85 (d, 1H, *J* 6.1 Hz, CH₃); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 217.35 (C3), 199.23 (C11), 177.25 (C28), 163.43 (C13), 130.61 (C12), 60.78 (C9), 55.41 (C18), 52.81 (C5), 51.96 (COOCH₃), 47.70 (C17), 47.70 (C4), 44.54 (C14), 43.88 (C8), 39.76 (C1), 38.66 (C19), 38.66 (C20), 36.79 (C10), 35.94 (C22), 34.29 (C2), 32.41 (C7), 30.32 (C21), 28.48 (C15), 26.46 (C23), 23.88 (C16), 23.88 (C6), 21.46 (C27), 21.02 (C30), 21.02 (C24), 18.78 (C26), 15.58 (C25); HRMS *m/z*, calcd. for C₃₁H₄₆O₄Na: 505.6918, found: 507.3442.

28-Methoxy-11,28-dioxo-3,4-secours-12-ene-3,4-lactone (UAD12)

Derivative UAD11 (50 mg, 0.10 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL), following the addition of 77% *meta*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA) (55.3 mg, 0.25 mmol) and NaHCO₃ (147.2 mg, 1.75 mmol). After 24 h under magnetic stirring at room temperature, an additional quantity of 77% MCPBA (47.3 mg, 0.21 mmol) was added. The reaction mixture was maintained under the same conditions for an additional 16 h. EtOAc was added to the mixture, and it was sequentially washed with saturated aqueous NaHCO₃ and NaCl solutions, dried over anhydrous Na₂SO₄, and evaporated to dryness. The crude product (40.4 mg) was filtered over silica gel (eluent *n*-hexane/EtOAc 1:1) to afford UAD12 (24.9 mg, 48.2% yield). FTIR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2923 (C-H), 1721 (C=O), 1654 (C=O), 1232 (C-O), 1030 (C-O); $[\alpha]_D^{25} +135.00$ (*c* 0.5, CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.65 (s, 1H, H12), 3.61 (s, 3H, COOCH₃), 2.61 (m, 2H, H2a and H2b), 2.43 (d, 1H, *J* 11.1 Hz, H18), 1.47 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.37 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 1H, CH₃), 0.98 (s, 1H, CH₃), 0.96 (s, 3H, CH₃), 0.88 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 198.53 (C11), 177.21 (C3), 175.67 (C28), 163.21 (C13), 130.79 (C12), 85.66 (C4), 61.11 (C9), 54.45 (C5), 52.73 (C18), 51.96 (COOCH₃), 47.74 (C17), 44.61 (C14), 43.99 (C8), 39.69 (C10), 38.88 (C1), 38.70 (C20), 38.70 (C19), 35.98 (C22), 32.34 (C7), 32.34 (C2), 30.35 (C21), 28.37 (C15), 26.05 (C24), 23.92 (C16), 23.92 (C6), 22.12 (C27), 20.98 (C30), 18.41 (25), 17.49 (C29), 17.12 (C26); HRMS *m/z*, calcd. for C₃₁H₄₆O₅Na: 521.6912, found: 521.3265.

3 β -Acetoxyurs-12-en-28-oic acid (UAD13)

Derivative UAD13 was prepared under standard acetylation conditions using acetic anhydride in pyridine. After 24 h of reaction, ice was added ground and stirred for 15 min. The reaction mixture was extracted with EtOAc and washed with 0.5 N HCl. The organic phase was

dried over anhydrous Na_2SO_4 and the solvent eliminated in rotary evaporator being obtained as white crystals (194.8 mg, 89.2% yield). FTIR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3661 (O-H), 2924 (C-H), 1733 (C=O), 1694 (C=O), 1242 (C-O), 1455 (C-O-H), 1369 (C-O); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +54.30$ (*c* 1.00, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 5.29 (t, 1H, *J* 3.6 Hz, H12), 4.49 (m, 1H, H3), 2.17 (d, 1H, *J* 11.5 Hz, H18), 2.04 (s, 1H, OCOCH_3), 1.08 (s, 3H, CH_3), 0.94 (s, 3H, CH_3), 0.86 (d, 3H, *J* 6.1 Hz, CH_3), 0.86 (s, 3H, CH_3), 0.83 (s, 3H, CH_3), 0.80 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 172.96 (C28), 171.12 (OCOCH_3), 137.42 (C13), 126.24 (C12), 80.96 (C3), 55.35 (C5), 52.70 (C18), 49.35 (C17), 47.52 (C9), 42.22 (C14), 39.65 (C8), 39.14 (C19), 38.77 (C20), 38.40 (C1), 37.74 (C4), 36.90 (C10), 35.83 (C22), 33.04 (C7), 30.50 (C21), 28.11 (C23), 28.11 (C15), 24.25 (C16), 23.59 (C11), 23.59 (C2), 23.37 (C27), 21.39 (COCOCH_3), 21.16 (C30), 18.22 (C6), 17.27 (C29), 17.01 (C26), 16.79 (C25), 15.62 (C24); HRMS *m/z*, calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2\text{Na}$: 465.7136, found: 465.3730.

(13S)-3 β -Acetoxyurs-11-ene-28,13-lactone (UAD14)

The oxidation of derivative UAD13 (54 mg, 0.10 mmol) with $\text{NaClO}_2/t\text{-BuOOH}$ for 12 h afforded the white solid 3 β -acetoxy-11-oxours-12-en-28-oic acid (50 mg, 90.1% yield). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 5.56 (s, 1H, H12), 4.48 (dd, 1H, *J* 5.5, 10.9 Hz, H3), 3.57 (s, 3H, COOCH_3), 2.29 (s, 1H, H9), 2.02 (s, 3H, OCOCH_3), 1.22 (s, 3H, CH_3), 1.13 (s, 3H, CH_3), 0.96 (s, 3H, CH_3), 0.88 (s, 3H, CH_3). Then, the reduction of 3 β -acetoxy-11-oxours-12-en-28-oic acid with LiAlH_4 in diethyl ether, at 0 °C for 1 h, was followed by acetylation with acetic anhydride in pyridine and esterification with $\text{CH}_3\text{I}/\text{K}_2\text{CO}_3$. The final reaction product (43.3 mg) was chromatographed over silica gel (eluent *n*-hexane/EtOAc 9:1, 8:2 and 6:4) to afford UAD14 (10 mg, 23% yield). FTIR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2923 (C-H), 1755 (C=O), 1728 (C=O), 1238 (C-O); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +41.00$ (*c* 0.5, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 5.95 (dd, 1H, *J* 1.5, 10.4 Hz, H12), 5.54 (dd, 1H, *J* 3.0, 10.4 Hz, H11), 4.50 (m, 1H, H3), 2.05 (s, 3H, COOCH_3), 1.16 (s, 3H, CH_3), 1.15 (s, 3H, CH_3), 1.05 (s, 3H, CH_3), 1.00 (d, 3H, CH_3), 0.94 (s, 3H, CH_3), 0.94 (s, 3H, CH_3), 0.86 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 180.00 (C28), 171.11 (OCOCH_3), 133.36 (C12), 128.95 (C11), 89.70 (C13), 80.66 (C3), 60.59 (C18), 54.86 (C5), 52.96 (C9), 45.13 (C17), 41.97 (C14), 41.75 (C8), 38.70 (C19), 38.15 (C20), 38.00 (C1), 37.89 (C4), 36.31 (C10), 31.35 (C7), 31.20 (C22), 30.87 (C21), 27.78 (C23), 25.58 (C15), 23.37 (C2), 22.86 (C16), 21.39 (COOCH_3), 19.22 (C30), 18.96 (C26), 18.04 (C25), 17.93 (C29), 17.60 (C6), 16.09 (27), 16.09 (C24); HRMS *m/z*, calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Na}$: 519.7186, found: 519.3459.

3-Hydroxy-oxime-urs-12-en-28-oate (UAD15)

Derivative UAD1 (500 mg, 1.06 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL), following the addition of PDC (716 mg, 3.3 mmol). The reaction mixture was maintained for 3 h under magnetic stirring at room temperature. The crude product was filtered over silica gel (eluent *n*-hexane/EtOAc 1:1) to afford methyl 3-oxours-12-en-28-oate (371.9 mg). Then, methyl 3-oxours-12-en-28-oate (100 mg, 0.21 mmol) was dissolved in EtOH (10 mL) following the addition of anhydrous pyridine (0.1 mL) and $(\text{NH}_3\text{OH})\text{Cl}$ (25 mg, 0.36 mmol). The reaction mixture was maintained for 3 h under magnetic stirring at reflux and 95–100 °C temperature. The EtOH was evaporated and EtOAc was added to the mixture, than it was sequentially washed with saturated aqueous NaCl solution, dried over anhydrous Na_2SO_4 , evaporated to dryness to afford UAD15 (98 mg). FTIR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3660 (O-H), 2945 (C-H), 1721 (C=O), 931 (N-O); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +22.00$ (*c* 1.00, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 5.24 (sl, 1H, H12), 3.59 (s, 3H, COOCH_3), 3.06 (m, 1H, H2b), 2.22 (m, 1H, H2a), 2.22 (d, 1H, *J* 11 Hz, H18), 1.14 (s, 3H, C27H_3), 1.04 (s, 3H, C25H_3), 1.02 (d, 3H, C23H_3), 0.93 (s, 3H, C30H_3), 0.84 (d, 3H, *J* 6.2 Hz, C29H_3), 0.76 (s, 3H, C26H_3), 0.76 (s, 3H, C24H_3); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 178.10 (C28), 166.85 (C3), 138.26 (C13), 125.51 (C12), 55.82 (C18), 52.96 (C5), 51.52 (COOCH_3), 44.14 (C17), 47.11 (C9), 42.11 (C14), 40.35 (C4), 39.58 (C8), 39.06 (C19), 38.88 (C20), 38.66 (C1), 37.04 (C10), 36.64 (C22), 32.74 (C7), 30.68 (C2), 30.68 (C21), 28.00 (C15), 27.34 (C23), 24.25 (C16), 24.25 (C11), 23.33 (C27), 21.20 (C24), 21.20 (C30), 19.07 (C6), 17.01 (C26), 17.01 (C29); HRMS *m/z*, calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Na}$: 506.3610, found: 507.3305.

3 β -Hydroxy-11-oxours-12-en-28-oate (UAD16)

Derivative methyl 3-oxours-12-en-28-oate (UAD10, 100 mg, 0.21 mmol) was dissolved in EtOAc (5 mL), following the addition of 0.2 mL of *t*-BuOOH 6 M at *n*-decane (1.20 mmol) and NaClO_2 (66 mg; 0.73 mmol). The reaction mixture was maintained for 12 h under magnetic stirring at reflux and 100–110 °C temperature. After this time, Na_2SO_3 aqueous solution 10% was added and extracted with EtOAc. The organic phase was washed successively with saturated aqueous NaHCO_3 solution and water; dried over anhydrous Na_2SO_4 and the solvent was removed on a rotary evaporator to afford 3,11-dioxours-12-en-28-oate (91 mg). Then, the derivative 3,11-dioxours-12-en-28-oate (UAD11, 50 mg, 0.10 mmol) was dissolved in 5 mL of the mixture of MeOH/THF (1:1) following the addition of $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (164 mg; 0.44 mmol) and 22 mg of NaBH_4 (0.57 mmol). The reaction mixture was maintained for 6 h under magnetic stirring at room temperature. The

crude product was filtered over silica gel (eluent *n*-hexane/EtOAc 1:1) to afford methyl 3-oxours-12-en-28-oate (371.9 mg). The solvent was evaporated, added Et₂O and it was washed with saturated aqueous NaCl solution, dried over anhydrous Na₂SO₄, evaporated to dryness to afford UAD16 (32.25 mg). FTIR (ATR) ν_{\max} / cm⁻¹ 3675 (O-H), 2970 (C-H), 1725 (C=O), 1659 (C=O); $[\alpha]_D^{25}$ +108.57 (*c* 0.7, CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.60 (s, 1H, H12), 3.61 (s, 3H, COOCH₃), 3.22 (m, 1H, H3), 2.80 (m, 1H, H2a), 2.75 (m, 1H, H2b), 2.42 (d, 1H, *J* 11.2 Hz, H18), 2.30 (s, 1H, H9), 1.12 (s, 3H, C27H₃), 0.99 (s, 3H, C25H₃), 0.96 (d, 3H, *J* 5.0 Hz, C30H₃), 0.90 (s, 3H, C23H₃), 0.86 (d, 1H, *J* 6.1 Hz, C29H₃), 0.79 (s, 3H, C26H₃), 0.79 (s, 3H, C24H₃); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 200.01 (C11), 177.29 (C28), 162.96 (C13), 130.73 (C12), 78.83 (C3), 61.52 (C9), 55.01 (C18), 52.76 (C5), 51.92 (COOCH₃), 47.70 (C17), 44.72 (C14), 43.77 (C8), 39.17 (C1), 38.66 (C19), 38.66 (C20), 37.19 (C10), 37.19 (C4), 36.01 (C22), 33.07 (C7), 30.35 (C21), 28.44 (C15), 28.15 (C23), 27.34 (C2), 23.99 (C16), 21.05 (C30), 21.05 (C27), 18.89 (C26), 17.49 (C6), 17.16 (C24), 16.28 (C29), 15.65 (C25); HRMS *m/z*, calcd. from C₃₁H₄₄O₄ [M + Na]: 503.3137, found: 503.3442.

3-Oxo,11-hydroxyurs-12-en-28-oate (UAD17)

To a solution of the derivative 3-oxours-12-en-28-oate (50 mg, 0.11 mmol) in 4.0 mL of CH₂Cl₂ was added 5,10,15,20-tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin (3.5 mg, 3 mol%) and MCPBA 55% (44.32 mg, 0.26 mmol). The reaction mixture was maintained under stirring and inert atmosphere at -78 °C for 30 h. At the end of this period, saturated aqueous solutions of NaHCO₃ and Na₂S₂O₃ were added, followed by extraction with EtOAc. The organic phase was washed with saturated aqueous NaCl solution, dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solvent removed on a rotary evaporator, yielding 44.9 mg of a residue. This was chromatographed on a silica gel column (packed column dimensions: 10 × 220 mm) using *n*-hexane:EtOAc mixtures (9:1; 8:2; 1:1) as eluents. The fractions were pooled according to the profiles at three groups: starting material (the derivative 3-oxours-12-en-28-oate, 17.4 mg) was recovered from the first combined fractions group, while the second combined fractions group provided 13.3 mg (30%) of the derivative 3,11-dioxours-12-en-28-oate, and the third combined fractions group provided 25.1 mg of the UAD17 (56%) mixture of isomers. FTIR (ATR) ν_{\max} / cm⁻¹ 3646 (O-H), 2921 (C-H), 1726 (C=O), 1706 (C=O), 1241 (C-O); $[\alpha]_D^{25}$ +65.10 (*c* 1.00, CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.30 (d, 1H, *J* 3.6 Hz, H12), 4.29 (dd, *J* 3.6 and 8.8 Hz, 1H, H11), 3.61 (s, 3H, COOCH₃), 2.27 (d, 1H, *J* 10.4 Hz, H18), 1.10 (s, 3H, C27H₃), 1.06 (s, 3H, C25H₃), 0.96 (d, 3H, *J* 5.3 Hz, C30H₃), 0.94 (s, 3H, C23H₃), 0.91

(s, 3H, C26H₃), 0.88 (d, 3H, *J* 6.4 Hz, C29H₃), 0.84 (s, 3H, C24H₃); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 217.91 (C3), 178.03 (C28), 139.88 (C13), 129.55 (C12), 68.27 (C11), 55.62 (C9), 52.18 (C5), 51.78 (C18), 51.71 (COOCH₃), 47.74 (C17), 47.37 (C4), 42.89 (C8), 42.89 (C14), 40.68 (C1), 38.73 (C19), 38.73 (C20), 38.26 (C10), 36.42 (C22), 34.54 (C7), 34.43 (C2), 30.57 (C21), 28.07 (C15), 26.94 (C23), 24.14 (C16), 23.44 (C27), 21.31 (C30), 19.69 (C6), 18.78 (C29), 18.22 (C26), 17.16 (C24), 17.01 (C25); HRMS *m/z*, calcd. for C₃₁H₄₄O₄ [M + Na]: 503.3137, found: 503.3453.

3 β ,28-Dihydroxyurs-9,12-diene (UAD18)

In a suspension of LiAlH₄ (62 mg, 1.63 mmol) and 2.0 mL of dry ethyl ether was added the derivative 3,11-dioxours-12-en-28-oate (62 mg, 0.13 mmol), solubilized in 4.0 mL of dry ethyl ether. The reaction mixture was kept under stirring at room temperature for 4 h. At the end of this period, the excess LiAlH₄ was removed by dripping with wet ether followed by water trickling. 2 mol L⁻¹ HCl was added, extracted with EtOAc, and the organic phase was washed with saturated aqueous NaCl solution. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, and after removal of the solvent on a rotary evaporator, 44 mg of a residue was obtained. This was subjected to fractionation on a silica gel column, using the *n*-hexane:EtOAc (8:2 and 1:1) and EtOAc as eluents. The fractions were pooled according to the profiles and the derivative UAD18 (5.2 mg, 9%) was obtained from the first fractions group. FTIR (ATR) ν_{\max} / cm⁻¹ 3662 (O-H), 2941 (C-H), 1690 (C=C), 1240 (C-O); $[\alpha]_D^{25}$ +7.80 (*c* 3.5, CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.58 (d, 1H, *J* 6.0 Hz, H11), 5.51 (d, 1H, *J* 6.0 Hz, H12), 3.60 (d1, 3H, *J* 11 Hz, H28a), 3.24 (d, 1H, *J* 11 Hz, H28b), 3.22 (m, 1H, H3), 1.21 (s, 3H, C27H₃), 1.16 (s, 3H, C25H₃), 1.03 (s, 3H, C23H₃), 0.94 (d, 3H, *J* 5 Hz, C30H₃), 0.95 (s, 3H, C26H₃), 0.83 (d, 3H, *J* 5 Hz, C29H₃), 0.82 (s, 3H, C24H₃); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 155.09 (C9), 140.19 (C13), 123.45 (C12), 115.29 (C11), 78.76 (C3), 70.21 (C28), 52.37 (C18), 51.12 (C5), 43.11 (C8), 40.72 (C14), 39.36 (C19), 38.73 (C20), 38.07 (C4), 38.07 (C17), 37.30 (C22), 35.17 (C1), 31.93 (C7), 30.61 (C21), 29.77 (C15), 28.26 (C23), 27.93 (C2), 25.47 (C16), 25.47 (C27), 21.53 (C30), 18.33 (C6), 17.66 (C26), 17.31 (C29), 15.69 (C25), 15.69 (C24); HRMS *m/z*, calcd. for C₃₀H₄₄O₂ [M + Na]: 459.3239, found: 459.3553.

Cell culture

RAW264.7 macrophage cell lines were placed in 96-well plates, containing RPMI-1640 supplemented (2.0 mM L-glutamine, 100.0 μ g mL⁻¹ of streptomycin and penicillin, 5% fetal bovine serum), at 1 × 10⁶ cells mL⁻¹

or 2×10^5 cells mL^{-1} by 3 or 48 h, respectively. Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere in the presence or absence of the UA or ursolic acid derivatives (UAD1, UAD2, UAD3, UAD4, UAD5, UAD6, UAD7, UAD8, UAD9, UAD10, UAD11, UAD12, UAD13, UAD14, UAD15, UAD16, UAD17 or UAD18) at 15, 30, 60 or 90 μM . The compounds have been solubilized in DMSO, never exceeding 0.1% (v/v), and diluted in RPMI-1640 before the use. The DMSO concentration was determined to allow the solubilization of the UAD and UA but without affecting the RAW264.7 viability.¹⁸

MTT assay

Cellular viability was measured using the MTT assay. After 48 h of culture, the supernatants were removed and the cells were incubated with 100 μL of supplemented RPMI-1640 and 10 μL of MTT (5.0 mg mL^{-1}), during 4 h at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. After purple formazan crystal formation, the supernatants were gently removed and crystal products were solubilized with DMSO. Complete solubilization was obtained by shaking the plates. The optical density (OD) values were determined in the Multiskan microplate reader (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 560 nm wavelength. The cellular viability was presented as the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) calculated using Prism software (GraphPad Prism 5.00, San Diego, CA, USA).²⁸

Nitric oxide concentration in RAW264.7

The NO concentration was measured by the Griess method, in the supernatant of the 48 h of culture. To perform the test, 100 μL of the supernatant from each well was transferred to 96-well plates and an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride, 5% H_3PO_4) was added. The NO concentration was determined by comparison with a standard sodium nitrite solution and the values were determined by the Multiskan microplate reader (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 540 nm wavelength.

NF- κB concentration in RAW264.7

The cells that were cultured for 3 h were detached after this period and stained for the analysis of the p65 expression (indirectly NF- κB),²⁷ following the instructions of the manufacturer. The cells were acquired in the FACSVerse (BD, Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) and

analysed in the FCS Express software (De Novo software, Pasadena, CA, USA).²⁹

Induction of acute inflammation by carrageenan-induced paw edema

BALB/c (female) mice 6-8 weeks old ($n = 6$ per group) were obtained from the animal care facilities of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, and maintained in micro isolator cages. All procedures were in accordance with the principles of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals and were approved by the committee on the use of laboratory animals from UFVJM (Protocol No. 03/2018r). The mice were monitored for clinical signs of toxicity after the treatments. Initially, the mice were weighed (26.57 ± 0.31 g) and their right and left paws were measured (0 h) with a pachymeter (Mitutoyo, Kawasaki, Japan). The treatments, phosphate buffered saline (PBS), dexamethasone (0.5 mg kg^{-1}), UA (200 mg kg^{-1}), UAD 1 (200 mg kg^{-1}) and UAD2 (200 mg kg^{-1}), were administered intraperitoneally (100 μL) 30 min before the induction of the edema. Dexamethasone was used as a positive control treatment due to its anti-inflammatory activity. Carrageenan (2.5%) was dissolved in PBS, and 20 μL injected into the left footpad, and 20 μL of PBS into the right footpad of all groups. The left and the right paws were measured after 1, 2, 3 and 4 h after the injection of carrageenan and the differences were calculated. The magnitude of the carrageenan-induced paw edema was determined as follows: [paw edema / mm] = [footpad thickness of carrageenan / mm] – [footpad thickness of PBS / mm].³⁰

Cytokine production

Cytokine production was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available antibodies according to the instructions of the manufacturer (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). The plates were read at the Multiskan microplate reader (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 450 nm wavelength.¹⁸ Supernatants of the 48 h macrophage culture were used to evaluate the TNF. The TNF production (%) was calculated using the formula $(X1/X2) \times 100$, considering X1 the TNF production (pg mL^{-1}) of stimulated and treated cells and X2 the mean TNF production (pg mL^{-1}) of stimulated and untreated cells. The IL-6 productions were measured in the mice paw and lymph nodes, after euthanasia. Paw tissue and lymph nodes were removed and homogenized (100 mg mL^{-1}) in the extraction solution containing 0.4 M NaCl, 0.05%

Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 M PMSF, 0.1 M benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 kIU mL⁻¹ aprotinin. The homogenate was centrifuged at 2000 ×g for 15 min at 4 °C and supernatants were collected to determine the concentration of IL-6.

Statistical analysis

The results represent at least three independent experiments and are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). All data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni posttests (GraphPad Prism 5.00, San Diego, CA, USA),²⁸ and the differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion

The ten UA semisynthetic derivative compounds were synthesized (Figures 1 and 2) with previously described structural modifications. The synthesis of derivatives UAD1 to UAD8 was previously published by Scherrer *et al.*²⁷ The structures were elucidated by NMR spectra recorded in CDCl₃ on a Bruker AC200 at 200 MHz for ¹H and 50 MHz for ¹³C. The obtained spectra of the compounds correspond to the data in the literature.^{31,32} Spectral data of the methyl 3β-hydroxyurs-12-en-28-oate (UAD1), methyl 3β-acetoxy-11-oxours-12-en-28-oate (UAD2), methyl 3β-acetoxy-11-oxours-12-en-28-oate (UAD3) and methyl 3β-acetoxyurs-9(11), 12-dien-28-oate (UAD4), urs-12-ene-3β,11,28-triol (UAD5), (17*S*)-3β-hydroxy-22

(17 → 18)-abeours-11-en-28-al (UAD6), (urs-11, 13(18)-diene-3β, 28-diyl diacetate) (UAD7), (13*S*)-13, 28-epoxyurs-11-en- 3β-ol (UAD8) were previously published.²⁷

Biological activity

The cytotoxicity index (IC₅₀) and NO production by RAW264.7 macrophages, treated with UA or the UADs, were shown in the Table 1. The IC₅₀ was obtained by the MTT test of the unstimulated cells treated with UA or UADs and the respective controls corresponding to untreated cells. Besides the viability, the Table 1 shows the results of NO production by RAW264.7 macrophages treated with UA or the UADs, stimulated with LPS and interferon (IFN)-γ after 48 h of culture.

The compounds UA, UAD1, UAD2, UAD3, UAD6, UAD8 and UAD9 were able to reduce the NO production, compared to the untreated stimulated RAW264.7 cells at all tested concentrations. The compounds UAD4, UAD5, UAD7, UAD10, UAD17 and UAD18 reduced the NO production at 30, 60 and 90 μM. Only the UAD12 and UAD15 were not able to reduce NO production (Table 1). The IC₅₀ was greater than 90 μM when the cells were treated with UAD2, UAD3, UAD4, UAD7, UAD9, UAD10, UAD11, UAD14 and UAD15. The UAD1 was the closest to the IC₅₀ of the UA (Table 1).

The percentage of NF-κB expression by RAW264.7 was shown in Table 2. The UA, UAD1, UAD2, UAD3, UAD4, UAD5, UAD6, UAD7, UAD8, UAD11, UAD12,

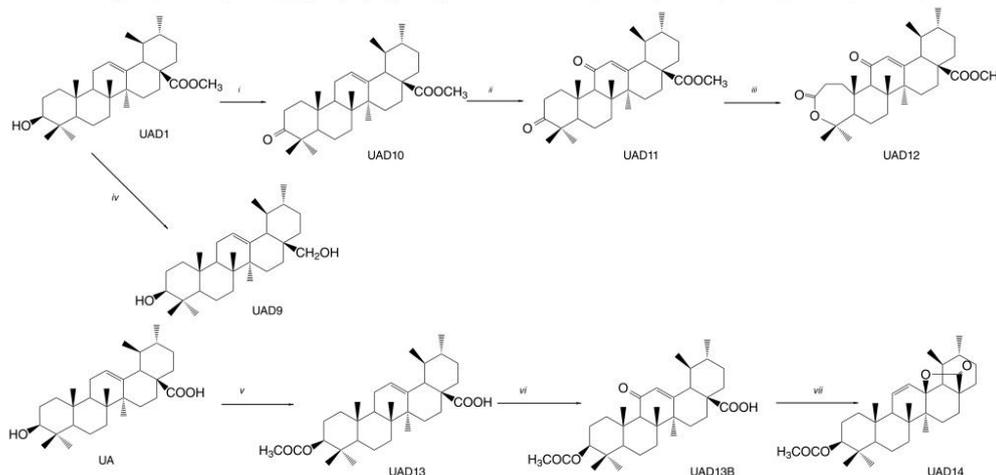


Figure 1. Synthesis of the ursolic acid derivatives. Reaction conditions *i*: pyridinium dichromate (PDC), room temperature; *ii*: NaClO₂/*t*-BuOOH; *iii*: MCPBA/NaHCO₃, room temperature; *iv*: LiAlH₄, room temperature; *v*: acetic anhydride/pyridine, room temperature; *vi*: NaClO₂/*t*-BuOOH, 100 °C; *vii*: LiAlH₄, 0 °C; acetic anhydride/pyridine; CH₃I/K₂CO₃, room temperature.

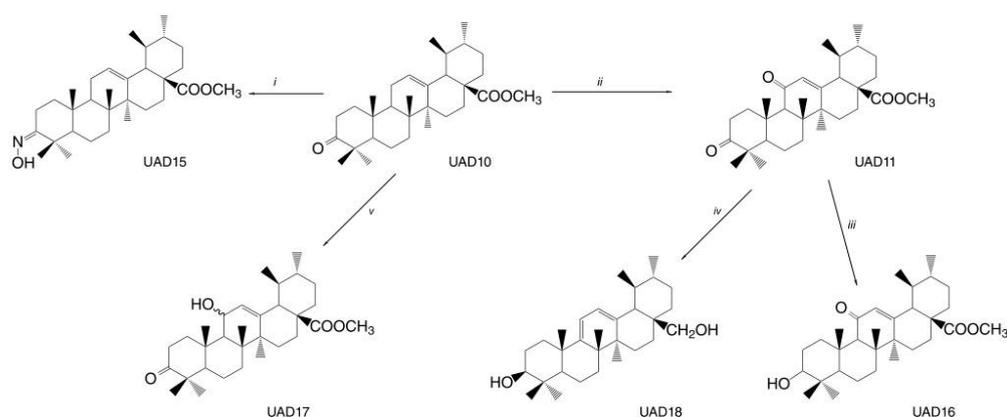


Figure 2. Synthesis of the ursolic acid derivatives. Reaction conditions *i*: pyridine/(NH₂OH)Cl, 95–100 °C; *ii*: EtOAc/*t*-BuOOH, *n*-decane/NaClO₂/Na₂SO₃, 100–110 °C (reflux); *iii*: MeOH/THF, CeCl₃·7H₂O/NaBH₄, room temperature; *iv*: LiAlH₄/diethyl ether, room temperature; *v*: 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl) porphyrin/MCPBA, –78 °C.

Table 1. NO production by RAW264.7 macrophages treated with UA or UAD, after 48 h of culture and cytotoxicity index (IC₅₀)

Compound ^a	NO production / μM				IC ₅₀ / μM
	15 μM ^b	30 μM ^b	60 μM ^b	90 μM ^b	
UA	9.65 ± 0.51 ^c	3.05 ± 1.16 ^c	1.99 ± 0.15 ^c	2.12 ± 0.83 ^c	17.06
UAD1	3.98 ± 0.44 ^c	4.69 ± 0.07 ^c	2.63 ± 0.37 ^c	1.66 ± 0.07 ^c	9.64
UAD2	8.05 ± 0.31 ^c	8.55 ± 0.47 ^c	6.69 ± 1.10 ^c	4.75 ± 0.61 ^c	> 90
UAD3	9.99 ± 1.85 ^c	9.13 ± 1.03 ^c	7.96 ± 1.33 ^c	6.10 ± 1.76 ^c	> 90
UAD4	14.32 ± 0.63	10.47 ± 0.93 ^c	8.05 ± 1.35 ^c	8.94 ± 0.27 ^c	> 90
UAD5	11.41 ± 1.33	8.39 ± 1.10 ^c	2.98 ± 0.38 ^c	4.56 ± 0.27 ^c	39.89
UAD6	10.72 ± 1.63 ^c	10.75 ± 0.19 ^c	4.08 ± 0.72 ^c	0.93 ± 0.21 ^c	74.62
UAD7	11.51 ± 2.40	8.18 ± 2.22 ^c	7.09 ± 0.99 ^c	5.83 ± 1.53 ^c	> 90
UAD8	10.79 ± 1.03 ^c	9.85 ± 0.60 ^c	3.63 ± 0.53 ^c	3.46 ± 0.70 ^c	47.25
UAD9	10.98 ± 1.75 ^c	10.87 ± 0.67 ^c	5.95 ± 0.30 ^c	5.51 ± 0.95 ^c	> 90
UAD10	12.19 ± 1.11	9.86 ± 0.87 ^c	5.96 ± 0.15 ^c	6.05 ± 2.12 ^c	> 90
UAD11	10.11 ± 2.37	10.28 ± 2.82	9.15 ± 0.08 ^c	9.89 ± 1.26 ^c	> 90
UAD12	21.06 ± 1.02	13.23 ± 1.55	12.77 ± 1.21	12.55 ± 0.54	88.76
UAD13	20.44 ± 3.29	15.32 ± 4.58	13.32 ± 1.35	8.57 ± 0.75 ^c	34.60
UAD14	16.33 ± 1.41	13.77 ± 1.89	10.98 ± 1.61	7.25 ± 1.92 ^c	> 90
UAD15	14.76 ± 0.34	17.34 ± 2.24	10.82 ± 1.70	10.59 ± 2.22	> 90
UAD16	13.59 ± 0.57	10.28 ± 4.06	9.02 ± 0.07 ^c	7.62 ± 1.83 ^c	24.60
UAD17	12.46 ± 2.61	10.45 ± 0.63 ^c	8.91 ± 1.26 ^c	6.01 ± 0.42 ^c	80.05
UAD18	12.46 ± 1.38	10.52 ± 1.35	8.58 ± 1.30 ^c	6.98 ± 0.56 ^c	63.40

^aCompounds: ursolic acid (UA) and ursolic acid derivative (UAD); ^btreatment concentration; ^c*p* < 0.05 in relation to the nitric oxide (NO) production of the untreated stimulated RAW264.7 cells (14.77 ± 2.52). IC₅₀: half maximal inhibitory concentration.

UAD13, UAD14, UAD15 and UAD18 inhibited the NF-κB percentage expression at all concentrations tested. The UA, UAD1, UAD2, UAD3 showed a dose-dependent inhibition (Table 2).

The percentage of TNF produced by RAW264.7 was inhibited by the UAD7, UAD12, UAD13, UAD14, UAD15

and UAD18 in all concentrations tested. The UAD1, UAD10, UAD11 and UAD16 reduced the TNF production in concentrations above 15 μM. All the compounds reduced the production of TNF at 60 and 90 μM (Table 3).

A study³³ has already shown that NF-κB is a well-known transcription factor in the inflammatory process,

Table 2. Percentage of the NF- κ B expression by RAW264.7 macrophages treated with UA and UAD, after 3 h of culture

Compound ^a	NF- κ B expression / %			
	15 μ M ^b	30 μ M ^b	60 μ M ^b	90 μ M ^b
UA	13.59 \pm 0.29 ^c	7.91 \pm 0.11 ^c	8.15 \pm 0.31 ^c	6.95 \pm 0.20 ^c
UAD1	12.77 \pm 0.32 ^c	11.98 \pm 0.51 ^c	9.65 \pm 0.08 ^c	3.03 \pm 0.11 ^c
UAD2	15.11 \pm 0.28 ^c	14.78 \pm 0.19 ^c	11.27 \pm 0.32 ^c	8.45 \pm 0.08 ^c
UAD3	15.06 \pm 0.15 ^c	14.45 \pm 0.09 ^c	10.43 \pm 0.22 ^c	8.76 \pm 0.20 ^c
UAD4	9.77 \pm 0.37 ^c	11.11 \pm 0.20 ^c	9.17 \pm 0.26 ^c	10.47 \pm 0.16 ^c
UAD5	15.42 \pm 0.20 ^c	12.22 \pm 0.23 ^c	12.75 \pm 0.18 ^c	13.96 \pm 0.24 ^c
UAD6	12.08 \pm 0.12 ^c	12.08 \pm 0.06 ^c	13.97 \pm 0.16 ^c	13.93 \pm 0.27 ^c
UAD7	12.09 \pm 0.11 ^c	11.65 \pm 0.16 ^c	11.10 \pm 0.18 ^c	11.84 \pm 0.14 ^c
UAD8	13.64 \pm 0.19 ^c	15.12 \pm 0.16 ^c	14.96 \pm 0.12 ^c	14.54 \pm 0.15 ^c
UAD9	16.15 \pm 0.48	16.27 \pm 0.19	11.75 \pm 0.12 ^c	15.52 \pm 0.24 ^c
UAD10	14.66 \pm 0.23 ^c	17.73 \pm 0.29	16.67 \pm 0.34 ^c	18.40 \pm 0.35 ^c
UAD11	12.71 \pm 0.27 ^c	14.81 \pm 0.29 ^c	15.26 \pm 0.31 ^c	14.04 \pm 0.17 ^c
UAD12	9.04 \pm 0.55 ^c	13.66 \pm 0.54 ^c	11.29 \pm 0.86 ^c	11.98 \pm 0.11 ^c
UAD13	9.64 \pm 0.23 ^c	11.62 \pm 0.24 ^c	11.21 \pm 0.23 ^c	8.96 \pm 0.09 ^c
UAD14	11.07 \pm 0.19 ^c	9.968 \pm 0.06 ^c	11.79 \pm 0.26 ^c	9.37 \pm 0.28 ^c
UAD15	10.08 \pm 0.17 ^c	9.708 \pm 0.19 ^c	10.36 \pm 0.18 ^c	9.34 \pm 0.19 ^c
UAD16	22.69 \pm 0.46	16.29 \pm 0.21	15.66 \pm 0.08	3.38 \pm 0.11 ^c
UAD17	17.20 \pm 0.50	15.14 \pm 0.23 ^c	15.12 \pm 0.29 ^c	13.39 \pm 0.10 ^c
UAD18	11.27 \pm 0.03 ^c	11.72 \pm 0.19 ^c	12.12 \pm 0.14 ^c	11.49 \pm 0.18 ^c

^aCompounds: ursolic acid (UA) and ursolic acid derivative (UAD); ^btreatment concentration; ^c $p < 0.05$ NF- κ B expression by RAW264.7 macrophages treated with UA or UADs *versus* RAW264.7 not treated (NF- κ B expression control: 17.24 \pm 0.41). NF- κ B: nuclear factor kappa B.

Table 3. Percentage of the TNF production by RAW264.7 macrophages treated with UA and UADs

Compound ^a	TNF production / %			
	15 μ M ^b	30 μ M ^b	60 μ M ^b	90 μ M ^b
UA	> 100	90.01 \pm 8.08 ^c	26.13 \pm 5.98 ^c	23.98 \pm 2.09 ^c
UAD1	> 100	74.55 \pm 9.52 ^c	21.07 \pm 0.33 ^c	17.98 \pm 1.79 ^c
UAD2	> 100	89.05 \pm 6.69	31.73 \pm 2.18 ^c	30.41 \pm 1.36 ^c
UAD3	> 100	> 100	33.48 \pm 2.08 ^c	33.01 \pm 2.72 ^c
UAD4	> 100	91.13 \pm 15.32	41.80 \pm 2.78 ^c	32.64 \pm 4.11 ^c
UAD5	> 100	> 100	48.02 \pm 1.28 ^c	32.38 \pm 1.60 ^c
UAD6	> 100	> 100	36.66 \pm 2.82 ^c	28.24 \pm 1.03 ^c
UAD7	67.02 \pm 1.72 ^c	37.97 \pm 3.85 ^c	15.78 \pm 0.81 ^c	14.82 \pm 2.14 ^c
UAD8	> 100	79.98 \pm 12.35	19.55 \pm 0.63 ^c	14.43 \pm 0.71 ^c
UAD9	> 100	> 100	19.83 \pm 0.63 ^c	14.56 \pm 1.83 ^c
UAD10	84.01 \pm 6.38	42.33 \pm 0.96 ^c	17.58 \pm 1.13 ^c	16.26 \pm 0.69 ^c
UAD11	77.09 \pm 8.78	55.80 \pm 3.63 ^c	21.72 \pm 1.52 ^c	16.87 \pm 0.56 ^c
UAD12	49.87 \pm 1.07 ^c	19.48 \pm 1.19 ^c	6.50 \pm 0.25 ^c	4.71 \pm 0.43 ^c
UAD13	51.30 \pm 2.07 ^c	24.66 \pm 1.48 ^c	9.69 \pm 0.55 ^c	12.39 \pm 1.03 ^c
UAD14	53.41 \pm 2.69 ^c	16.34 \pm 0.73 ^c	10.92 \pm 1.41 ^c	10.81 \pm 0.59 ^c
UAD15	61.05 \pm 3.85 ^c	27.68 \pm 2.01 ^c	11.50 \pm 1.14 ^c	10.46 \pm 0.60 ^c
UAD16	93.81 \pm 4.97	50.35 \pm 1.39 ^c	10.81 \pm 0.92 ^c	4.67 \pm 0.46 ^c
UAD17	> 100	> 100	74.88 \pm 0.55 ^c	40.87 \pm 3.34 ^c
UAD18	69.51 \pm 1.20 ^c	71.82 \pm 4.95 ^c	61.87 \pm 4.40 ^c	25.20 \pm 2.09 ^c

^aCompounds: ursolic acid (UA) and ursolic acid derivative (UAD); ^btreatment concentration; ^c $p < 0.05$ percentage of the tumor necrosis factor (TNF) production by RAW264.7 macrophages treated with UA and UADs *versus* RAW 264.7 not treated (100%).

responsible for inducing the transcription of several pro- and anti-inflammatory mediator genes, including TNF. In the present work, the reduction in the expression of NF- κ B was accompanied by the reduction in the production of TNF, probably due to the incorporated transformations to obtain the UADs, which improved the compounds capacities to act on the NF- κ B, partly reported by other authors.^{20,34} Also, these modifications generated UADs with lower cytotoxicity than UA, except for the UAD1.

The structural modification of the UAD2, consists of the esterification of both C-3 and C-28 carbons,³⁵ which may be the factor that improved its capacity to reduce NO, being the compound that best reduced NO at 90 μ M, without altering cell viability. Also, it was able to inhibit the expression of NF- κ B in a dose response manner and to reduce the production of TNF at concentrations of 60 and 90 μ M.

The UAD1 and UAD2 were chosen to be used as a treatment on carrageenan-induced paw edema, for its similar results to UA in inhibiting inflammatory mediators, such as NF- κ B and NO, at the lowest concentrations tested. However, it is possible to recognize the potential in others UAD that deserves to be tested in the inflammatory models.

Both, UAD1 and UAD2, showed an effective reduction of paw edema of mice, as well as dexamethasone, compared to carrageenan group, who received only PBS treatment. The reduction in paw edema is already observed in the 2nd h and persists until the 4th h (Figure 3).

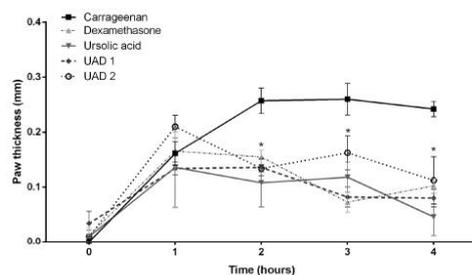


Figure 3. Carrageenan-induced paw edema. Female BALB/c mice ($n = 6$ per group) were treated intraperitoneally (i.p.) (100 μ L) with PBS (carrageenan group), UAD1 (200 mg kg^{-1}), UAD2 (200 mg kg^{-1}), ursolic acid (200 mg kg^{-1}) or dexamethasone (0.5 mg kg^{-1}), 30 min before the induction of the model. Paw edema [Paw edema / mm] = [footpad thickness of carrageenan / mm] – [footpad thickness of PBS / mm] were monitored until 4 h. * $p < 0.05$ UAD1, UAD2, UA and dexamethasone versus carrageenan group.

Regarding the analysis of IL-6 in the supernatant of the paw and lymph node macerates, a reduction of IL-6 was observed in the groups treated with UA and the derivatives UAD1 and UAD2 compared to the carrageenan group (Figures 4 and 5). Different studies³⁶⁻³⁸ have shown that

UA and derivatives are able to reduce the inflammatory marker IL-6. Rapid IL-6 production is also known to contribute to host defense during infection and tissue injury, but excessive IL-6 synthesis and dysregulation of IL-6 receptor signaling are involved in inflammatory and autoimmune disorders. Thus, various therapeutic agents have been evaluated to inhibit the cytokine itself or targets associated with its signaling pathway.^{39,40}

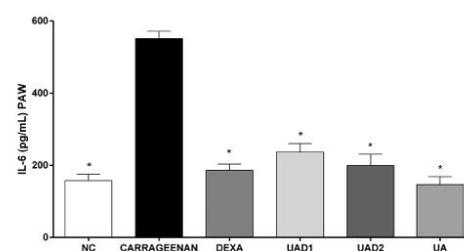


Figure 4. IL-6 in paw macerates. Female BALB/c mice ($n = 6$ per group) were treated i.p. (100 μ L) with PBS (carrageenan group), UAD1 (200 mg kg^{-1}), UAD2 (200 mg kg^{-1}), ursolic acid (UA 200 mg kg^{-1}) or dexamethasone (DEXA 0.5 mg kg^{-1}) and not treated group negative control (NC). After euthanasia, the paws were macerated and the supernatant was collected to dose IL-6 by ELISA. * $p < 0.05$ UAD1, UAD2, UA, dexamethasone and NC versus carrageenan group.

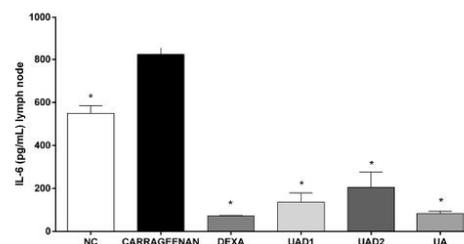


Figure 5. IL-6 in lymph node. Female BALB/c mice ($n = 6$ per group) were treated i.p. (100 μ L) with PBS (carrageenan group), UAD1 (200 mg kg^{-1}), UAD2 (200 mg kg^{-1}), ursolic acid (UA 200 mg kg^{-1}) or dexamethasone (DEXA 0.5 mg kg^{-1}) and not treated group negative control (NC). After euthanasia, the lymph nodes were macerated and the supernatant was collected to dose IL-6 by ELISA. * $p < 0.05$ UAD1, UAD2, UA, dexamethasone and NC versus carrageenan group.

Conclusions

The results obtained demonstrated a variation in the response between the derivatives, due to their chemical modifications, but with potential to reduce the inflammatory mediators evaluated. Regarding paw edema, the UAD1 and UAD2 proved to be as efficient as dexamethasone, an anti-inflammatory used in clinical practice. Furthermore, the investigation of the other derivatives, in *in vivo* models of inflammation, deserves to be expanded.

Supplementary Information

Supplementary information about the compounds spectrum data (Figures S1-S35) are available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br> as PDF file.

Acknowledgments

This work was supported in part by Grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (431816/2018-2; 460184/2014-w8, CNPQ-NANO 550321/2012-8, 308278/2020-8 and 437418/2018-9), CT-INFRA 2013/FINEP (FINEP 0633/13); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-02506-22; APQ 02423-18; APQ03152-18; APQ-03536-16 and APQ-01293-14) and Federal University of Juiz de Fora.

Author Contributions

Elaine C. Scherrer was responsible for running the laboratory work and the analysis of data and data curation and writing original draft; Ydía M. Valadares for conceptualization, funding acquisition, in chemical synthesis, chemical analysis and writing original draft; Bárbara G. R. Fernandes for running the laboratory work and supporting the analysis of data and data curation; Karla A. Ramos for supporting the laboratory work and data analysis; Paloma E. Carvalho for supporting the laboratory work and data analysis; Fernando S. Silva for the conceptualization, biological analysis, funding acquisition and writing-review and editing the manuscript; Maiara R. Salvador for supporting the laboratory work and data analysis; Jeferson G. da Silva for chemical analysis, funding acquisition and writing original draft; Alessandra P. Carli for biological analysis and critical review of the manuscript; Caio C. S. Alves for conceptualization, funding acquisition, resources and writing original draft, writing - review and editing; Ângelo M. L. Denadai for funding acquisition, resources and the revision of the manuscript in this resubmission; Sandra B. R. Castro lead the conceptualization, project administration, funding acquisition, visualization and writing the original draft.

References

- Sakaguchi, S.; *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 531. [Crossref]
- Park, M.-Y.; Kwon, H.-J.; Sung, M.-K.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2009**, *73*, 828. [Crossref]
- Korhonen, R.; Lahti, A.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E.; *Curr. Drug Targets: Inflammation Allergy* **2005**, *4*, 471. [Crossref]
- Tracey, D.; Klareskog, L.; Sasso, E. H.; Salfeld, J. G.; Tak, P. P.; *Pharmacol. Ther.* **2008**, *117*, 244. [Crossref]
- Bradley, J. R.; *J. Pathol.* **2008**, *214*, 149. [Crossref]
- Bharti, A. C.; Aggarwal, B. B.; *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 883. [Crossref]
- Dorrington, M. G.; Fraser, I. D. C.; *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 705. [Crossref]
- Sorriento, D.; Illario, M.; Finelli, R.; Iaccarino, G.; *Transl. Med. UniSa* **2012**, *4*, 73. [Crossref]
- Zhang, C.; Xu, S.-H.; Ma, B.-L.; Wang, W.-W.; Yu, B.-Y.; Zhang, J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2575. [Crossref]
- Zhou, H. Y.; Shin, E. M.; Guo, L. Y.; Zou, L. B.; Xu, G. H.; Lee, S. H.; Ze, K. R.; Kim, E. K.; Kang, S. S.; Kim, Y. S.; *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *572*, 239. [Crossref]
- Choi, H. J.; Eun, J. S.; Park, Y. R.; Kim, D. K.; Li, R.; Moon, W. S.; Park, J. M.; Kim, H. S.; Cho, N. P.; Cho, S. D.; Soh, Y.; *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *601*, 171. [Crossref]
- Katz, S.; Zsiros, V.; Kiss, A. L.; *Inflamm. Res.* **2019**, *68*, 525. [Crossref]
- Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T.; *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a016295. [Crossref]
- Kiss, A. L.; *Pathol. Oncol. Res.* **2022**, *27*, 1610136. [Crossref]
- Rose-John, S.; *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a028415. [Crossref]
- Dinarello, C. A.; *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 519. [Crossref]
- Sims, J. E.; Smith, D. E.; *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 89. [Crossref]
- Castro, S. B. R.; Junior, C. O. R.; Alves, C. C. S.; Dias, A. T.; Alves, L. L.; Mazzoccoli, L.; Zoet, M. T.; Fernandes, S. A.; Teixeira, H. C.; Almeida, M. V.; Ferreira, A. P.; *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 347. [Crossref]
- Elsayed, E. A.; El Enshasy, H.; Wadaan, M. A.; Aziz, R.; *Mediators Inflammation* **2014**, *2014*, 805841. [Crossref]
- Checker, R.; Sandur, S. K.; Sharma, D.; Patwardhan, R. S.; Jayakumar, S.; Kohli, V.; Sethi, G.; Aggarwal, B. B.; Sainis, K. B.; *PLoS One* **2012**, *7*, e31318. [Crossref]
- Ikeda, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H.; *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 26. [Crossref]
- Saravanan, R.; Pugalendi, V.; *Pharmacol. Rep.* **2006**, *58*, 41. [Crossref]
- Ovesná, Z.; Kozics, K.; Slamenová, D.; *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2006**, *600*, 131. [Crossref]
- Habtemariam, S.; *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2019**, *2019*, 8512048. [Crossref]
- Perkins, N. D.; *Oncogene* **2006**, *25*, 6717. [Crossref]
- Sun, S.-C.; Chang, J.-H.; Jin, J.; *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 282. [Crossref]
- Scherrer, E. C.; Valadares, Y. M.; Alves, C. C. S.; Ferreira, G. F.; Leão, M. P.; Soares, J. A.; Silva, F. S.; Carli, A. P.; Cardoso Jr., O.; Machado, F. S.; Castro, S. B. R.; *J. Cancer Ther.* **2019**, *10*, 863. [Crossref]
- GraphPad Prism*, version 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, USA, 2007.
- DeNovo*, FCS Express, 7; Pasadena, California, USA, 2019.

30. Cardoso Jr., O.; Lima, N. M.; Silva, M. G. A.; Aguiar, V. B.; Carli, G. P.; Scherrer, E. C.; Castro, S. B. R.; Alves, C. C. S.; Oliveira, M. A. L.; Carli, A. P.; *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 4819. [Crossref]
31. Tkachev, A. V.; Denisov, A. Y.; Gatilov, Y. V.; Bagryanskaya, I. Y.; Shevtsov, S. A.; Rybalova, T. V.; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11459. [Crossref]
32. Takeoka, G.; Dao, L.; Teranishi, R.; Wong, R.; Flessa, S.; Harden, L.; Edwards, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3437. [Crossref]
33. Wallace, J. L.; Ignarro, L. J.; Fiorucci S.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 375. [Crossref]
34. Patil, K. R.; Mohapatra, P.; Patel, H. M.; Goyal, S. N.; Ojha, S.; Kundu, C. N.; Patil, C. R.; *PLoS One* **2015**, *10*, e0125709. [Crossref]
35. Bai, K.-K.; Chen, F.-L.; Yu, Z.; Zheng, Y.-Q.; Li, Y.-N.; Guo, Y.-H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4043. [Crossref]
36. Sahu, S.; Li, R.; Kadeyala, P. K.; Liu, S.; Schachner, M.; *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *55*, 219. [Crossref]
37. Tripathi, P.; Alshahrani, S.; *Hum. Exp. Toxicol.* **2021**, *40*, S397. [Crossref]
38. Lee, J. Y.; Choi, J. K.; Jeong, N. H.; Yoo, J.; Há, Y. S.; Lee, B.; Choi, H.; Park, P. H.; Shin, T. Y.; Kwon, T. K.; Lee, S. R.; Lee, S.; Lee, S. W.; Rho, M.-C.; Kim, S.-H.; *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *49*, 118. [Crossref]
39. Kang, S.; Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T.; *Immunity* **2019**, *50*, 1007. [Crossref]
40. Garbers, C.; Heink, S.; Korn, T.; Rose-John, S.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2018**, *17*, 395. [Crossref]

Submitted: November 10, 2022
Published online: March 14, 2023



ANEXO D - Publicação de capítulo de livro

CHAPTER 45

SEVEN
publicações acadêmicas

Multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: A review



<https://doi.org/10.56238/uniknowindevolp-045>

Roberta Mello Cachuba

Medical Student at the Faculty of Medicine of Mucuri. Mucuri School of Medicine, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Teófilo Otoni, MG, Brazil.

E-mail: robertacachuba@gmail.com

Elaine Carlos Scherrer

Master in Biochemistry and Molecular Biology Institute of Life Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brazil.

E-mail: elainescherrer569@gmail.com

Karla Antunes Ramos

Master in Technology, Environment and Society Mucuri School of Medicine, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Teófilo Otoni, MG, Brazil.

E-mail: karlaantunesramos@gmail.com

Alessandra Paula Carli

Doctor in Biological Sciences - Structural Biochemistry and Molecular Biology Institution: Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys – UFVJM Mucuri School of Medicine, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Teófilo Otoni, MG, Brazil.

E-mail: alessandra.pcarli@ufvjm.edu.br

Sandra Bertelli Ribeiro Castro

Doctor in Brazilian Health Mucuri School of Medicine, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Teófilo Otoni, MG, Brazil.

E-mail: bertelli.ribeiro@ufvjm.edu.br

Caio César Souza Alves

Doctor in Brazilian Health Mucuri School of Medicine, Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Teófilo Otoni, MG, Brazil.

E-mail: caio.alves@ufvjm.edu.br

ABSTRACT

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system, characterized by mononuclear cell infiltration, axon demyelination and gliosis in the myelin sheath, with

formation of multiple plaques. It affects individuals aged between 25 and 50 years old, female and residents of higher latitudes. The etiology of multiple sclerosis is multifactorial and not fully understood; however, the influence of genetic predisposition and environmental factors on immune dysregulation is recognized. The pathophysiology of the disease is mediated by self-reactive T lymphocytes that respond to autoantigens from the central nervous system. The emergence of multifocal regions of demyelination, axonal loss, loss of oligodendrocytes and astroglial scarring result in impaired neurological function, leading to neurodegeneration. Although there is still no cure for multiple sclerosis, scientific research has provided great advances in therapeutic strategies. Currently there are approaches to attenuate specific signs and symptoms, drugs to control disease relapses and treatments designed to modify or delay the course of multiple sclerosis. Although these drugs show promising effects, they are ineffective in curing the patient. In addition, they present a fundamental problem, which is the non-selective action on the cells of the immune system, which triggers serious side effects. Considering the limitations of studies in humans due to the difficulty of accessing the affected tissues, the use of experimental models that simulate the singularities of multiple sclerosis is a key element for the study of the pathogenesis of inflammation and therapeutic alternatives. Experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model that presents several similarities with pathophysiological, histological and clinical aspects of multiple sclerosis, is the most used model for these studies. Therefore, in this chapter, the aim was to review the historical context, definition, etiology, pathophysiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment of multiple sclerosis and, at the same time, address aspects of the timeline, induction, the evolutionary course and the immunopathogenesis of the most studied model for the investigation of the nuances of multiple sclerosis, correlating the similarities and differences between both.

Keywords: Multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, neural degeneration, revision.



1 INTRODUCTION

Multiple sclerosis was first reported in the year 1200 in an Icelandic woman and in St. Lidwina of Schiedam (1380-1433). Other accounts reveal the daily struggle British writer W. N. P. Barbellion (1889-1919) with the clinical manifestations of the disease (LANDTBLOM *et al.*, 2010). Some writers such as Charles Dickens used fictional characters to document neuroinflammatory disorders in their novels (BRAIN, 1955; PETZOLD, 2013). In 1866, a series of coherent articles on *La sclerose en plaques* was published by Jean Martin Charcot, considered the father of neurology at the La Salpêtrière hospital in Paris. Charcot elaborated presuppositions about the pathophysiology of the disease, correlating it with the clinic, thus contributing to the creation of the first diagnostic criterion of multiple sclerosis, named Charcot's triad, consisting of nystagmus (involuntary, rhythmic and repetitive ocular oscillations of one or both eyes), ataxia (lack of coordination of movements of different parts of the body) and dysarthria (difficulty in articulating speech). Pierre Marie, Charcot's successor, suggested in 1884 the infectious etiology of multiple sclerosis, which to this day is the most acceptable (MILO; MILLER, 2014).

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system, characterized by infiltration of mononuclear cells, demyelination of the axon and gliosis in the myelin sheath, with formation of multiple plaques (MILO; MILLER, 2014). Such destruction of the myelin sheath of the axons produces a blockage of the electrical impulse to the target cells, resulting in a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from speech disorders to total paralysis (GOVERMAN, 2009). The pathophysiology of the disease is mediated by self-reactive T lymphocytes that respond to central nervous system autoantigens. The emergence of multifocal regions of demyelination, axonal loss, loss of oligodendrocytes and astroglial scars result in deficit of neurological function, leading to a neurodegenerative process (FONTES *et al.*, 2014; DIAS *et al.*, 2014; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; KIPP *et al.*, 2017; FONTES *et al.*, 2017; MCGINLEY *et al.*, 2018). The disease is characterized by periods of relapse and remission in some people, while a progressive pattern is noticed in others, impairing the quality of life of those affected, because the crises gradually compromise the neurological capacity of the sick (MILO; MILLER, 2014). In the scientific literature it is recognized that multiple sclerosis usually affects a profile of individuals aged between 25 to 50 years of age (although it can occur at all ages), female sex and residents of areas far from the equator (PEREIRA *et al.*, 2015).

Recent data from the 2020 Atlas of Multiple Sclerosis, prepared by the International Federation of Multiple Sclerosis with the World Health Organization (WHO), showed that the prevalence of the disease is increasing worldwide, reaching 2.8 million in 2020, with a global prevalence of 35.9 per 100,000 people. This aspect points to the challenges faced by the sick, such as access to diagnosis and treatment. The prevalence of multiple sclerosis is related to geographic distribution, according to a



meta-analysis by Simpson *et al.* (2019), confirming that increased prevalence of the disease is still strongly associated with increased latitude. As for the prevalence of multiple sclerosis by region of the world, between 2013 and 2020 an increase of 87% was observed in the Americas, 59% in Africa, 58% in Southeast Asia, 38% in the Eastern Mediterranean, 32% in the Western Pacific and 32% in Europe. Europe continues to be the region with the highest incidence (per 100,000 people/year), reaching the value of 6.8, while the Americas register 4.8 and Southeast Asia and Africa have incidence rates of 0.4 (ASCHERIO; MUNGER, 2016; BLOZIK *et al.*, 2017; COETZEE; Thompson, 2020; WALTON *et al.*, 2020). Brazil, in turn, has an average prevalence of 8.69/100,000 inhabitants and, as in the world, the prevalence varies according to the region of residence of the patient, being lower in the Northeast (1.36 per 100 thousand inhabitants) and higher in the South (27.2 per 100 thousand inhabitants), confirming the relationship between multiple sclerosis and latitude (PEREIRA *et al.*, 2015).

The disease usually occurs in young individuals and is more common in females. Global reports indicate that multiple sclerosis is more frequent in women, and in some countries the ratio is four women to one man (COETZEE; Thompson, 2020; WALTON *et al.*, 2020). In a systematic review of 28 epidemiological studies from 1955 to 2000, an increase in the incidence of multiple sclerosis in the female/male ratio was found to be increased from 1.4 to 2.3 (ALONSO; HERNÁN, 2008) and, subsequently, a systematic review with meta-analysis also suggested the increased incidence of the disease in women (KOCH-HENRIKSEN; Sørensen, 2010). This difference in the incidence of the disease between genders still has an unknown cause. It is suggested that hormonal factors may be related to this female predisposition to the disease (ABREU *et al.*, 2012).

The etiology of multiple sclerosis is multifactorial and not fully clarified (ZAGON; MCLAUGHLIN, 2017), however, the influence of genetic predisposition and environmental factors on the immune dysregulation verified in the pathogenesis of the disease is recognized (ABREU *et al.*, 2012; WAUBANT *et al.*, 2019). Therefore, it is impossible to estimate the risk of developing the disease based on genetic susceptibility alone (MUNGER *et al.*, 2006).

The genetic component of multiple sclerosis results from the action of common allelic variants in many genes and the emerging contribution of rare variants, thus involving a complex network of molecular and functional interactions. Recently, considerable progress has been made in understanding the genetic basis of susceptibility to multiple sclerosis. Thus, to date, using genome-wide association screens (GWAS), which incorporate large matrices of single nucleotide polymorphisms (SNPs) spread throughout the genome, more than 200 common risk variants located in diverse genomic regions have been identified. (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; ANDLAUER *et al.*, 2016; DARGAHI *et al.* 2017; NOURBAKHSI; MOWRY, 2019). Some *loci* may be related to early pathogenic events, while others may influence the development and progression of the disease. The class II major histocompatibility complex (MHC) was the first *locus* of susceptibility to multiple sclerosis to be



identified and has several independent susceptibility variants (MOUTSIANAS *et al.*, 2015), with the genetic factor with the strongest link with multiple sclerosis being the *HLA-DRB1*15:01 haplotype* (CANTO; OKSENBERG, 2018; WAUBANT *et al.*, 2019). In twin studies, the genetic influence is clearly observed, with the concordance rate for multiple sclerosis in monozygotic twins being 30%, in contrast to 5% for dizygotic twins. With regard to the degree of kinship, the risk of multiple sclerosis in first-degree relatives is about 1 in 40, being 20 times higher than in the general population. For second-degree relatives, the risk is 1 in 100, that is, about 10 times higher than in the general population (WILLER *et al.*, 2003).

Regarding environmental risk factors, we can include smoking, obesity, previous contact with the Epstein-Barr virus and vitamin D deficiency, frequently noted in populations of regions with low solar incidence, an aspect that explains the correlation between multiple sclerosis and latitude (ASCHERIO; MUNGER, 2016; CORREALE; FAREZ, 2015; NEW; BATISTA, 2017; FERRE *et al.*, 2018; Simpson *et al.*, 2019; JAKIMOVSKI *et al.*, 2019; WAUBANT *et al.*, 2019; Sollid, 2022).

The immunopathogenesis of multiple sclerosis involves the activation of T and B lymphocytes that act against central nervous system antigens, leading to progressive axonal loss, brain atrophy, and neurological and cognitive impairment (BIERHANSL *et al.*, 2022). In multiple sclerosis several defects have been identified in the mechanisms of self-tolerance. Failure in the so-called central tolerance mechanisms occurs in the thymus for T cells and in the bone marrow for B cells (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). In central tolerance, a dysfunction of the thymic production of antigen-specific T cells was observed, with alterations in the receptors of T cells, favoring autoimmune reactions (WUCHERPFENNIG *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2011), *in addition to being noted a premature involution of the thymus resulting in the reduced export of virgin regulatory T cells, the fully suppressing regulatory T clone* (HAAS *et al.*, 2007). In peripheral tolerance the failure is linked to co-stimulatory molecules and to transcriptional and epigenetic mechanisms (GONSETTE, 2012).

Consequently, self-reactive cells that escape central tolerance can be activated in peripheral lymphoid organs by autoantigens that present molecular mimicry with some proteins characteristic of the central nervous system, such as myelin proteins (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). The basic protein of myelin (MBP), the proteolipid protein (PLP) and the glycoprotein of oligodendrocyte myelin (MOG) are studied as candidates for target autoantigens of lymphocyte reactivity verified in the immunogenesis of multiple sclerosis (HELLINGS *et al.*, 2001).

Once activated, virgin CD4+ T cells undergo differentiation into subtype 1 (Th1) and subtype 17 (Th17) helper T cells that secrete inflammation mediators such as interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-17 (IL-17), respectively. During the activation process, antigen-presenting cells and T cells produce substances that modulate the immune response. Th1-profile immune responses are commanded by interleukin-12 (IL-12), IFN- γ , and interleukin-18 (IL-18), while Th17-profile immune



responses are mediated by transforming growth factor- β (TGF- β), interleucine-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-23 (IL-23). Activated self-reactive T lymphocytes also have an increased ability to cross the blood-brain barrier due to their high expression of mediators, such as chemokine receptors, adhesion molecules, integrins and cytokines (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; MILOVANOVIC *et al.*, 2020). Although some cells can cross the blood-brain barrier intact, access to the central nervous system by activated helper T cells occurs only after the blood-brain barrier has been disrupted. The entry of cells is facilitated by some molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-selectin and metalloproteinase-9 (MMP-9) (PICCIO *et al.*, 2002). Central nervous system homeostasis is maintained primarily by controlling cell traffic across the blood-brain barrier. Therefore, the importance of the blood-brain barrier in the early pathogenesis of inflammation of the central nervous system is revealed, an aspect further corroborated by the fact that its endothelial cells induce the differentiation of CD209 dendritic cells and, subsequently, secrete interleukin-12p70 (IL-12p70), TGF- β and IL-6, thus providing the differentiation of virgin cells into effector cells of Th1 or Th17 profile (IFERGAN *et al.*, 2008). It is assumed that an autoimmune response that causes overexpression of inflammation mediators in sick individuals, such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-3 (IL-3), IFN- γ , TNF- α and tumor necrosis factor- β (TNF- β), induces the expression of specific molecules in the membrane of central nervous system cells and activates the phagocytic function of microglia cells, as we will see below (REZENDE; ARRUDA, 1998). It is also worth noting that in addition to CD4+ T cells, CD8+ T cells predominate and proliferate in the central nervous system, exhibiting a relevant role in myelin and oligodendrocyte injury, due to the interaction with MHC class I present in oligodendrocytes, neural bodies and axons (VIEGAS, 2009). In addition, it is known that patients with multiple sclerosis, especially in relapses, have a large number of cytotoxic molecules, such as perforin, expressed by CD8+ T cells (FRISULLO *et al.*, 2011).

Th1 and Th17 profile effector cells enter the central nervous system and are reactivated and expanded by the cytokines IL-1 β , IL-12, IL-6 and IL-23 produced by the resident microglia and infiltrating monocytes. The degradation of the myelin sheath releases fragments that, in turn, are presented by antigen-presenting cells (APCs) residing in the central nervous system and reactivate CD4+ T cells, resulting in the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines. Among the mediators of inflammation secreted, IFN- γ stands out, responsible for the recruitment of CD8+ cells, B lymphocytes and monocytes, leukocytes that also leave the lymph nodes, cross the blood-brain barrier and penetrate the central nervous system. CD8+ cells attack the oligodendrocytes that synthesize myelin, thereby exacerbating neuronal damage. The activation of B lymphocytes by costimulation of T lymphocytes promotes, in turn, the production of autoantibodies related to even more intense damage to the myelin sheath and axon. Microglia ultimately phagocytize the myelin



sheath and release pro-inflammatory cytokines that increase the local immune response. The progression of multiple sclerosis is characterized, therefore, by infiltration of T and B cells, astrogliosis and microgliosis, processes that contribute to structural and functional changes of the nervous system (LASSMANN, 2018; REDFERN, 2021).

In the immune dysregulation of multiple sclerosis, Th17 profile effector cells are attributed a high pathogenic potential in relation to Th1 profile effector cells due to some peculiarities of the Th17 subtype such as: greater proliferative capacity, reduced susceptibility to suppression, greater plasticity of function, expression of a melanoma cell adhesion molecule (MCAM) or CD146 and greater efficiency in migration by the blood-brain barrier (PASSOS *et al.*, 2016; BUTCHER; ZHU, 2018) through the secretion of inflammation mediators, such as IL-17, with the ability to damage the integrity of the blood-brain barrier and, consequently, stimulate the migration of cells to the central nervous system (CHENG; CHEN, 2014).

The pathophysiological process of microglial activation in multiple sclerosis is known to induce several phenotypic modifications. Depending on activation, microglia may play a role in the destruction of nerve tissue by the pro-inflammatory M1 phenotype at the onset of multiple sclerosis or tissue repair by the M2 phenotype in later remission of the disease. In response to IFN- γ released by Th1 profile effector cells, the M1 phenotype increases the expression of class II MHC, becomes an antigen-presenting cell, and releases pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-23, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (KYRAN *et al.*, 2018). The M1 phenotype is found primarily in the aggressive and progressive forms of multiple sclerosis and has been histopathologically associated with axonal damage and cortical atrophy in these patients (LASSMANN, 2017; ZETTERBERG, 2017; MASVEKAR *et al.*, 2018). The M2 phenotype also presents a phagocytic phenotype and triggers anti-inflammatory responses through the release of interleukin-10 (IL-10) and TGF- β (FILIPPI; ROCCA, 2020; BAR-OR; LI, 2021).

Multiple sclerosis presents variables that reflect pathways to tissue damage (TOBORE, 2021). Inflammation, demyelination and degeneration of axons are changes caused by the main triggering mechanisms of the disease (COMPSTON; COLES, 2008). About 5-10% of the saltatory propagation along the axon is compromised by demyelination. This occurs due to the reduction of internal sodium channels, which constitutes the physiological basis of most of the clinical manifestations of the disease (SCOLDING; FRANKLIN, 1998). For more than a century, neurodegeneration, that is, axonal and/or neuronal damage, has been reported as a component of multiple sclerosis (CHARCOT, 1886), and the identification of neurons, glial cells and myelin patterns in multiple sclerosis and experimental models of the disease is fundamental (VIEGAS, 2009).

In multiple sclerosis, axonal degeneration and destruction of the myelin sheath are responsible for several scattered lesions in the central nervous system, with a predilection for optic nerves, spinal



cord and periventricular white matter (KLEFBECK; NEDJAD, 2003). These lesions spread in time and space, resulting in neurological deficits of variable course (UNPHRED, 2004). The initial lesions in the human brain with the disease are characterized by swelling, vacuolization, fragmentation and separation of myelin from the axon, large influx of microglia and macrophages, which are responsible for the enzymatic degradation of myelin, phagocytosis and apoptosis of oligodendrocytes. Some areas have increased inflammatory activity, active destruction of myelin, remyelination and proliferation of oligodendrocytes from precursor cells; axons, at first, show minimal lesions, but in the long term, they are destroyed (FRANKLIN; FFRENCH-CONSTANT, 2008). The demyelination plaque in any region of the white matter of the central nervous system is the fundamental lesion, presenting variable extension. This plaque has clear characteristics on fresh examination, such as a firm elastic consistency and pink color at the beginning of the disease and, later, grayish, being close to the ventricular surfaces and, in general, limited by the corpus callosum and caudate nucleus, in the dorsolateral region (LOPES *et al.*, 1987). Multiple sclerosis has specific components of the lesion that include inflammation of the blood-brain barrier, demyelination after direct destruction of myelin and/or oligodendrocytes, axonal damage, cortical involvement, remyelination, and gliosis. These factors can be observed depending on the phase or clinical stage of the lesion, since classically the active lesions imply in some degree of active damage of the myelin, identified by the presence of its digestion by macrophages (BRUCK *et al.*, 1995). The presence of multifocal inflammatory infiltrates (T cells, B cells and macrophages) in the central nervous system is another histopathological marker associated with the degradation of myelin, oligodendrocytes and axons, as well as reactive astrogliosis and microglia activation (FROHMAN; RACKE; RAINE, 2006; MUNGER *et al.*, 2006).

Depending on the affected area of the central nervous system, multiple sclerosis may appear as episodic seizures or as a continuous progression (DUFFY; LEES; MOALEM-TAYLOR *et al.*, 2014), affecting mental health and giving rise to musculoskeletal disorders that contribute to the reduction of the quality of life of people affected by the disease (LO *et al.*, 2021). The clinical manifestations of multiple sclerosis involve cognitive changes, signs and symptoms of pyramidal syndrome (weakness, spasticity, unilateral or bilateral clonus, hyperreflexia and Babinski's sign), cerebellar dysfunctions with impaired balance and motor coordination, sensory changes such as paresthesia (tingling or numbness) accompanied or not by superficial and deep hypoesthesia in one or more limbs, paroxysmal signs and symptoms (dysarthria, ataxia, dysclonus or tonic spasms and paroxysmal pains such as trigeminal neuralgia), visual disturbances (reduced visual acuity, diplopia and scotomas), psychiatric disorders, sphincter involvement (with urinary and/or fecal incontinence or retention) and sexual dysfunction (OLIVEIRA; SOUZA, 1998).

Multiple sclerosis is associated with varied evolutionary courses. Currently, four forms of presentation of the disease are considered, also known as types or phenotypes, according to the



classification postulated by the *International Advisory Committee on Clinical Trials of Multiple Sclerosis* in 2013. Clinically isolated syndrome (CIS) results from inflammation and demyelination in the central nervous system and represents the first episode of neurological clinical manifestations lasting at least 24 hours. The relapsing-remitting phenotype (RR) is characterized by episodes of neurological dysfunction followed by partial or complete remission. The secondary-progressive phenotype (SP) follows the initial course of the RR type, but is characterized by a progressive worsening of disability over time. In the primary-progressive phenotype (PP), finally, progressive worsening occurs from the beginning of multiple sclerosis, without relapses. The RR, SP and PP forms may present four variants according to inflammatory activity or disability progression: non-progressive/non-active, non-progressive/active, progressive/non-active, progressive/active. Although not considered a multiple sclerosis phenotype, radiologically isolated syndrome (RIS) has been used to classify individuals with abnormalities on magnetic resonance imaging of the brain and/or spinal cord consistent with multiple sclerosis lesions that are not explained by another diagnosis and that do not present current or past neurological signs and symptoms or abnormalities found on neurological examination (LUBLIN *et al.*, 2014). Not infrequently, these individuals undergo magnetic resonance imaging because of random complaints and lesions similar to those observed in multiple sclerosis are found unpretentiously. The study by LEBRUN-FRENAY *et al.* (2020) showed that just over half of people with RIS develop multiple sclerosis within ten years, which reveals the indispensability of health professionals not to neglect suspicious findings.

Currently, there is no specific diagnostic test for multiple sclerosis. Although MRI scans of the brain and spinal cord and cerebrospinal fluid analysis can help, diagnosis is still based on clinical criteria (ARRAMBIDE *et al.*, 2019; SOLOMON *et al.*, 2019; SALAZAR *et al.*, 2022). This occurs because the disease is heterogeneous in terms of clinical manifestations, course and progression of disability. In most cases, after an initial phase characterized by reversible episodes of neurological dysfunction, clinical disability and cognitive impairment become irreversible. The diagnosis of multiple sclerosis requires a careful exclusion of alternative diagnoses and a demonstration of a pathological process of dissemination in space and time (THOMPSON *et al.*, 2018).

The diagnosis of multiple sclerosis can be made using McDonald's criteria. The first set of criteria was published in 2001 by a team led by Professor Ian McDonald (MCDONALD *et al.*, 2001). They have been extensively reviewed, the most recent version being published in 2017 (THOMPSON *et al.*, 2018). The most current reviews did not change the diagnosis of multiple sclerosis, but made it possible for the diagnosis to be made early in the course of the disease. This allows the patient to have access to appropriate treatment early. The main requirement for the diagnosis of multiple sclerosis is evidence of damage to the central nervous system that spreads in time and space. This means showing that the injury occurred on different dates (Dissemination in time or DIT) and in different parts



(Dissemination in space or DIS), thus favoring the distinction of the disease from other neurological conditions. The McDonald criteria use MRI evidence and suggest that this imaging test be performed by all individuals with suspected multiple sclerosis. The lesions can be found even in oligosymptomatic or asymptomatic people, a characteristic that is evidence of DIS. The presence of oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid is also a great marker for multiple sclerosis, as it evidences previous activity of the disease and thus can be used as evidence of DIT (THOMPSON *et al.*, 2018; HARTUNG *et al.*, 2019; ARRAMBIDE *et al.*, 2019). In patients with multiple sclerosis, an increase in antibodies, especially immunoglobulin G (IgG), antibodies against oligodendrocyte and myelin glycoproteins, and activated complement components was evidenced in the cerebrospinal fluid (LALIVE *et al.*, 2006; LUCCHINETTI *et al.*, 2000; LUTTEROTTI; BERGER; REINDL, 2007).

Although there is still no cure for multiple sclerosis, scientific research has provided major advances in therapeutic strategies. Currently there are attenuating approaches to specific signs and symptoms, drugs for the control of disease relapses, and treatments designed to modify or slow the course of multiple sclerosis. Drugs capable of altering the course of multiple sclerosis are called disease-modifying therapies (DMTs) (FILIPPI; ROCCA, 2020). Even with the correct use of medications, not all patients are responsive, considering the heterogeneity of the disease. Despite progress in treatment, the rate of progressive disability and early mortality is still worrisome (GHOLAMZAD *et al.*, 2018; HAUSER; CREE, 2020). In addition, adverse effects and high cost are limiting factors. In Brazil, a study conducted with patients with multiple sclerosis, was determined an estimate of total average annual cost of R \$ 33,872.00 per patient (KOBELT *et al.*, 2019). Other sources show that, in Brazil, the treatment of multiple sclerosis conditions an average annual expenditure of approximately 38 thousand reais per patient. Depending on the severity of the disease and the perspective adopted, however, the costs can vary from 6500 reais to 157 thousand reais (SILVA *et al.*, 2016). Spending on disease-modifying therapies for the treatment of multiple sclerosis ranked in 2014 and 2015 the eighth place of highest drug expenditures in the United States of America (USA), according to the report published by the Quintiles IMS Institute in 2015 (AITKEN *et al.*, 2016). Thus, it is essential to prospect for effective and clinically and economically viable therapeutic alternatives.

The management of multiple sclerosis can be complex and involve pharmacological and non-pharmacological conducts, requiring a coordinated action by a multidisciplinary health team (BRASIL, 2021). Clinical improvement, increased functional capacity, reduction of comorbidities and attenuation of clinical manifestations are the goals of drug treatment. Glucocorticoids are used in the management of relapses and show short-term clinical benefit by reducing the intensity and duration of acute episodes (GAJOFATTO; BENEDETTI, 2015). In the last two decades, the emergence of drugs active in reducing outbreaks and/or disease progression, the so-called immunomodulators and immunosuppressants, in turn, represented a significant evolution in the treatment of multiple sclerosis



(BRASIL, 2021). In the course of the disease, modifying therapies promote the decrease of circulating immunogenic cells, the suppression of their adhesion to the epithelium and, consequently, the reduction of their migration to the parenchyma and the resulting inflammatory response (TABANSKY *et al.*, 2015). Among the drugs used and approved by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) for use in Brazil until April 2020, contained in the Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines (PCDT) of multiple sclerosis, we find teriflunomide, dimethyl fumarate, fingolimod, natalizumab, interferon beta and glatiramer acetate (BRASIL, 2021).

Teriflunomide is the drug indicated as the first option for the treatment of patients with multiple sclerosis RR phenotype. It is an immunomodulator with anti-inflammatory properties and promoter of selective and reversible inhibition of the mitochondrial enzyme dihydro-orotate dehydrogenase. This enzyme occupies the fourth position of the pyrimidine biosynthetic pathway, consequently causing the inhibition of new synthesis of certain substances and a subsequent cytostatic effect on the proliferation of T lymphocytes (GENZYME A SANOFI COMPANY, 2016; KLOTZ *et al.*, 2019). However, in patients with multiple sclerosis, the exact mechanism of action for therapeutic effects is still unknown and evidence suggests that it involves a reduction in the number of activated lymphocytes capable of migrating to the central nervous system (BRASIL, 2017; GENZYME A SANOFI COMPANY, 2016). The choice of teriflunomide for the treatment of patients with multiple sclerosis RR phenotype was based on evidence of the safety and efficacy of teriflunomide compared to current first-line therapeutic options for this clinical presentation of the disease. According to the recommendation report of the National Commission for the Incorporation of Technologies in the Unified Health System (CONITEC), no significant differences were found regarding efficacy and safety between teriflunomide and interferons-beta or glatiramer acetate (SPENCER *et al.*, 2015). Treatment with teriflunomide can lead to adverse reactions such as headache, diarrhea, nausea, alopecia, changes in the value of systemic blood pressure, decrease in leukocytes, elevation of liver enzymes, in addition to contributing to the worsening of pre-existing diseases such as interstitial lung disease (BRAZIL, 2017; GENZYME A SANOFI COMPANY, 2016).

Dimethyl fumarate is a first-line drug for the treatment of multiple sclerosis and has a mechanism of action that is not fully understood. Its clinical efficacy has been mainly attributed to a modulating effect on T cells. dimethyl fumarate was found to mitigate the number of circulating T cells, with a disproportionate reduction of the CD8+ subset. Corroborating these direct effects on circulating T cells, studies indicate that dimethyl fumarate contributes to the reduction of the pro-inflammatory activity of antigen-presenting cells, such as monocytes and dendritic cells (KORNBERG *et al.*, 2018; SCHULZE-TOPPHOFF *et al.*, 2016). The treatment done with Fumarate of methyl can lead to flushing and gastrointestinal events with an incidence $\geq 10\%$, in addition to other reactions with an incidence between 1% and 10 %, such as leukopenia, lymphopenia, burning sensation, hot



flash, vomiting, gastritis, itching, Proteinuria and increased aminotransferases (BARBUGIANI, 2015; BRAZIL, 2017).

The acetate of Glatiramer is a first-line drug in the treatment of multiple sclerosis RR phenotype and exerts an action immunomodulatory and neuroprotective. It is known that treatment with acetate of Glatiramer induces an increase in the levels of cytokines with activity anti-inflammatory drugs such as interleukin-4 (IL-4), IL-10 and TGF- β , in addition to a reduction in the levels of TNF- α , whose activity is pro-inflammatory (RACKE; LOVETT-RACKE, 2011). Treatment with acetate of Glatiramer may lead to adverse events such as flu, infection, anxiety, depression, vasodilation, dyspnoea, nausea, Rash cutaneous arthralgia, back pain, asthenia and chest pain with an incidence $\geq 10\%$. Among the effects whose incidence is around 1% and 10%, Found: weight gain, tremors, eye disorders, palpitations, tachycardia, vomiting, skin disorders, chills, edema of the face and vaginal candidiasis (BRAZIL, 2017; TEVA, 2014).

Interferons are cytokines with antiproliferative, immunomodulatory and antiviral functions that are categorized into 3 classes: type 1 (α and β), type 2 (γ) and type 3 (λ) (KNUTH *et al.*, 2019). Type 1 interferons can be produced by dendritic cells, such as IFN- α , and also by fibroblasts, such as IFN- β (REDER; FENG, 2014). Beta interferons are included in first-line drugs for the treatment of multiple sclerosis RR phenotype, and are made available by the Brazilian Unified Health System (SUS), including interferon- β -1a (IFN- β -1a) and interferon- β -1b (IFN- β -1b) (BRASIL, 2021). The use of interferons can lead to side effects such as flu-like syndrome (accompanied by fever, chills, myalgia, indisposition), psychic disorders, headache, abdominal pain, urinary incontinence, menstrual changes, rash and even reaction at the injection site (BAYER, 2016; BIOGEN, 2017). The monthly cost of treatment per person ranges from R\$3,660.00 to R\$4,472.00 (GANDRA, 2019).

Natalizumab is a humanized monoclonal antibody, immunoglobulin G4 (IgG4), which acts by preventing the migration of cells across the blood-brain barrier by binding to integrin alpha 4 beta 1 (VLA-4) present in lymphocytes. This process prevents interaction with the adhesion molecule VCAM-1 expressed by the vascular endothelium (ELICES *et al.*, 1990). Therefore, the natalizumab acts as a selective inhibitor of lymphocyte migration across the barrier hematoencephalic (HORGA; TINTORÉ, 2011), being usually prescribed in case of therapeutic failure or associated toxicity (intolerance, hypersensitivity or other side effect) to first- and second-line drugs in patients with multiple sclerosis RR phenotype. In addition, this drug becomes the first treatment option in multiple sclerosis RR phenotype in situations where the disease is in high activity (ENGELHARDT; KAPPOS, 2008). The use of the drug natalizumab may cause adverse reactions such as nausea, urticaria, dizziness, headache, stiffness associated with infusions, arthralgia, fatigue, gastroenteritis, vaginitis, depression, abdominal discomfort, and diarrhea. Such effects have an incidence $\geq 10\%$ in patients who use the drug. Liver damage and hyperbilirubinemia are also described in the scientific literature and



monthly monitoring of the patient's blood count is necessary due to serious reported cases of hemolytic anemia (BIOGEN, 2018).

Fingolimod is a synthetic structural analogue of sphingosine 1-phosphate (SOBIERA, 2010). Highly lipophilic, fingolimod is a prodrug metabolized *in vivo* by the action of the enzyme sphingosine kinase on the active metabolite fingolimod-phosphate, a non-selective modulator of sphingosine 1-phosphate receptors. The reduction in inflammatory activity and myelin-specific autoimmune responses that occur with the use of fingolimod are caused by blocking the migration of T lymphocytes from lymph nodes to the central nervous system (NOVARTIS, 2015; VOLPI *et al.*, 2019). Treatment with fingolimod may progress with infections, macular oedema, and transient atrioventricular blocks. Among the adverse reactions with an incidence $\geq 10\%$, we find headache, increased liver enzymes, diarrhea, cough, flu-like syndromes and back pain (NOVARTIS, 2015). Given the numerous side effects caused by synthetic drugs currently used for multiple sclerosis, the need to investigate new natural alternative medicines (MOJAVERROSTAMI is highlighted) ., 2018).

Although the aforementioned drugs show promising effects in the treatment of multiple sclerosis, they are ineffective in curing the patient. In addition, they present a fundamental problem, which is the non-selective action on the cells of the immune system, which triggers serious side effects such as progressive multifactorial leukoencephalopathy, skin rashes, increased rates of infections and ulcers, in addition to the treatment having long duration and high costs. For patients affected by multiple sclerosis, these variables lead to low adherence to treatment (JONES; COLES, 2010; PLATTEN; STEINMAN, 2006). Thus, the prospection of effective therapeutic alternatives with fewer adverse effects and less costs is necessary.

Considering the limitations of human studies due to the difficulty of access to the affected tissues and the rare performance of autopsies, the use of experimental models that simulate the singularities of multiple sclerosis, in this sense, is a key piece for the study of the pathogenesis of inflammation and autoimmune diseases of the central nervous system (MCGINLEY *et al.*, 2018; MILOVANOVIC *et al.*, 2020; BIRMPILI *et al.*, 2022). Experimental models of multiple sclerosis can be induced by autoimmunity (such as experimental autoimmune encephalomyelitis, the most studied prototype), viral infections, or exposure to toxins, and although they have advantages and disadvantages, none fully replicate the stages of the disease (BJELOBABA *et al.*, 2018). Specifically, experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model that presents several similarities with pathophysiological, histological and clinical aspects of multiple sclerosis, is induced via active immunization or adoptive transfer of reactive CD4+ T cells against myelin. According to the type of animal used and the material chosen for induction, there are different variations of the experimental autoimmune encephalomyelitis model (ROBINSON *et al.*, 2014; KIPP *et al.*, 2017; GLATIGNY;



BETTELLI, 2018), in an attempt to reproduce, in animals, the changes observed in multiple sclerosis in humans (SLOANE; LEDEBOER, 2009).

Most often, the study of the pathogenesis and treatment of diseases initially involves *in vitro* assays, and after a screening, the best molecules are transferred to the *in vivo* scale. Therefore, animals are the beginning for investigations of pharmacological mechanisms of action. Some studies resulting from the process in question have already provided important information related to physiology, immunology, cancer cure, Alzheimer's, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and others (PEREIRA *et al.*, 2020). In 1933, there was the description of the first model of autoimmune response from immunization with myelin of the central nervous system by Thomas Rivers (EPPS, 2005), who used repeated injections of rabbit brain extract in rhesus monkeys. This event boosted the reproduction of histopathological changes and clinical manifestations similar to those identified in multiple sclerosis in experimental models induced by the transfer of sensitized T lymphocytes or through active immunization with whole myelin proteins, myelin epitopes or fusion proteins (BATOULIS *et al.*, 2011; BERNARD *et al.*, 1997; LININGTON *et al.*, 1992), antigens normally emulsified in adjuvant, such as Freund's Complete Adjuvant (CFA) and Freund's Incomplete Adjuvant (IFA) (BATOULIS *et al.*, 2011). Thus, the experimental autoimmune encephalomyelitis model was consolidated. Inflammation in the central nervous system, demyelination of neurons, and motor changes that are present in multiple sclerosis are observed in this prototype of the disease (AL-OMAISHI; BASHIR; Gendelman, 1999; BAXTER, 2007), an aspect that proves the effectiveness of the referred model for the evaluation of the therapeutic potential of new drugs (SLOANE; Ledebøer, 2009; OLECHOWSKI *et al.*, 2010).

Normally, in the experimental model stimulated by active immunization, the subsequent process involves an induction phase, in which activation of CD4+ T cells specific for the myelin epitope occurs after immunization, and an effector phase, with several stages: (1) migration of myelin-specific T cells to the central nervous system; (2) production of cytokines and chemokines by myelin-specific T cells; (3) activation of peripheral monocytes/macrophages and resident microglial cells of the central nervous system by inflammation mediators secreted by myelin-specific T cells; (4) demyelination of axonal tracts of the central nervous system via phagocytic activity of activated mononuclear cells and cytotoxic effects of inflammation mediators secreted by myelin-specific T cells and monocytes, such as IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-17 and nitric oxide (NO) (MILLER; KARPUS; Davidson, 2007). In parallel, in the experimental model by adoptive transfer, the effector phase is modulated and there is no induction phase, since there is introduction of previously activated myelin-specific T cells in a healthy animal (MILLER; KARPUS; Davidson, 2007).

The popularity of the experimental autoimmune encephalomyelitis model for the study of multiple sclerosis presents clear reasons: (1) this is the first animal model for this purpose; (2) it is easily induced in many species (as in the syngenic mouse strains C57BL/6, SJL/J and PL/J); (3) the



appearance of clinical manifestations, such as paralysis and loss of tail tone (in rodents), has been reported in several studies; (4) MBP, an important autoantigen used in the induction of the model, is easy to extract and purify, besides being abundant in the nervous tissue and having a small size (the molecular weight is approximately 17 kDa in murine products), allowing the identification of critical determinants (SILVA; OF PAULA; FERREIRA, 2008; YANG, 2003).

The animals used to obtain the experimental model include non-human primates and rodents (mice, rats, and guinea pigs) (BJELOBABA *et al.*, 2018; LINKER; LEE, 2009).

Experimental autoimmune encephalomyelitis by active immunization is induced in rats (commonly of the Lewis or Dark Agouti strains) with MBP or one of its encephalitogenic epitopes, thus resulting in the infiltration of mononuclears into the spinal cord, brainstem, and cerebellum, but not into the brain (ROBINSON *et al.*, 2014). Lewis rats are uniformly susceptible to low doses of MBP (5-25 µg) and have a predictable onset time for disease onset, which is acute and spontaneously recovering, but these animals are resistant to attempts to reinduce the model (SWANBORG, 1995; WILLENBORG, 1979). In the case of the resistant strain of Brown-Norway rats, the disease arises from immunization with the extracellular domain of MOG in CFA and, after 10 days, it is noticeable the appearance of a fulminant clinical picture of the disease associated with diffuse demyelination and inflammatory infiltration containing polymorphonuclear cells and eosinophils (STEFFERL *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2014).

In mice, the most frequently used animals (ROBINSON *et al.*, 2014), experimental autoimmune encephalomyelitis by active immunization can be induced with intact proteins or with peptides of three myelin proteins, MBP, PLP and MOG. In the SJL (H-2s) strain of mice, immunization may involve MBP, PLP, or peptides corresponding to the immunodominant epitopes of MBP (MBP 84-104), PLP (PLP 139-151 and PLP 178-191), and MOG (MOG 92-106). In these animals, there is a prodromal period of 10-15 days followed by a clinical picture of ascending RR phenotype characterized at an initial moment by paralysis in the tail and hind legs, with progression of paralysis to the front legs, concomitant with weight loss. In PL/J (H-2u) and B10.PL (H-2u) mice, on the other hand, the disease is acute and self-limited, with no clinical recurrences. In this lineage, the expression of the disease is with courses of RR phenotype characterized by paralysis. In the C57BL/6 (H-2b) strain of mice, immunization occurs with the peptide corresponding to the immunodominant epitope of MOG (MOG 35-55) and the clinical course is chronic and progressive (MILLER; KARPUS; Davidson, 2007; Robinson *et al.*, 2014).

While in experimental models by active immunization the robust immune response caused by the adjuvant itself may be a confounding factor, in experimental models induced by adoptive transfer of specific T cells activated *in vitro* by an encephalitogenic peptide this does not happen, since only blast cells are injected intravenously or intraperitoneally into virgin or immunodeficient mice



(ROBINSON *et al.*, 2014). Another advantage of induction by adoptive transfer is the localization of populations of T cells *in vivo* in the course of the disease, since the transferred cells can be labeled with dyes or fluorescent proteins that enable the screening of encephalitogenic T cells (ROBINSON *et al.*, 2014). In rats of the Lewis lineage, the onset of the disease occurs 3–4 after the adoptive transfer, reaching a peak in 1–2 days and, subsequently, a complete remission in the sequential days, representing a model of acute disseminated encephalomyelitis, with a purely inflammatory pattern and minimal demyelination of the central nervous system (LINKER; LEE, 2009). In the case of mice, the adoptive transfer of the disease may also include transgenic animals with T cell receptors (TCR) (for example, C57BL/6 2D2 MOG35-55-specific or SJL/J 5B6 PLP139-151-specific), which enables the study of specific T cells of the myelin antigen (ROBINSON *et al.*, 2014).

From the above, it is noticeable that the expression of experimental autoimmune encephalomyelitis is different in rats and mice, which are usually preferred by researchers, since the histopathological findings in rats immunized with MBP include perivascular infiltration of mononuclear cells in the spinal cord and brainstem, as well as in the parenchyma of the central nervous system, but demyelination is minimal, while in mice immunized with MBP we found perivascular inflammation by mononuclear cells and demyelination, findings congruent with the pattern of multiple sclerosis (MARTIN; MCFARLAND; MCFARLIN, 1992; SWANBORG, 1995; YANG, 2003). In addition, the susceptible strains of SJL/J and PL/J mice are not resistant to disease re-induction, and it is possible to induce the chronic RR phenotype. However, the variability in the incidences and times of onset of the disease, together with the need to use adjuvants for the induction of the experimental model, are disadvantages of mice in relation to rats (SWANBORG, 1995; YANG, 2003).

Currently, the experimental autoimmune encephalomyelitis model in C57BL/6 mice is one of the most widely used in scientific research in neuroimmunology, with more than 100 publications in recent years (LINKER; LEE, 2009). Induction, in this case, occurs via immunization with a subcutaneous injection of an emulsion composed of MOG 35-55 and CFA, accompanied by intraperitoneal injection of pertussis toxin. The T cells are then activated in the periphery and migrate to the central nervous system through the blood-brain barrier, being reactivated and then commanding subsequent inflammation. The administration of pertussis toxin increases the permeability of the blood-brain barrier and, consequently, facilitates the migration of lymphocytes to the central nervous system, inducing an earlier onset and an intensification of the signs and symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis (HASSELMANN *et al.*, 2017; AHARONI *et al.*, 2021; HUNTEMANN *et al.*, 2022). C57BL/6 mice are quite useful in inducing chronic and severe experimental autoimmune encephalomyelitis, especially when applying MOG as a trigger. The lymphocytes of C57BL/6 mice exposed to this antigen express a higher number of T cell receptors for MOG and a higher titre of anti-MOG antibodies, resulting in a more severe form of the disease



(AHARONI *et al.*, 2021; KIPP *et al.*, 2017; CONTARINI; GIUSTI; SKAPER, 2017), characterized by inflammatory and demyelinating lesions in the optic nerve, brain, and spinal cord. Inflammatory infiltrates are perivascular and consist mostly of macrophages and T lymphocytes, and some degree of humoral response can be observed with the formation of significant titers of anti-MOG antibodies (KIPP *et al.*, 2017; AHARONI *et al.*, 2021). MOG is expressed only in the central nervous system and is located in cell bodies and oligodendrocyte processes, in the outer layer of the myelin sheath (KROEPFL *et al.*, 2002). Moreover, it is only found in the retina, brain and spinal cord and is only expressed at the end of myelination, and is not found in peripheral nerves (SOSPEDRA; MARTIN, 2005). This protein belongs to the superfamily of immunoglobulins and has 245 amino acids, whose sequence is highly conserved between rodents and humans, with approximately 89% homology between species (DE ROSBO; MENDEL; BEN-NUN, 1995). Because of its strategic location, it is directly accessible to antibodies and is therefore relevant as a target for the cellular and humoral immune responses of multiple sclerosis (SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Initially, the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis with MOG was obtained in Lewis rats by LINNINGTON *et al.* (1984), with reports of pathophysiological processes similar to those of multiple sclerosis, including encephalitogenic T cells and demyelination with axonal damage (LINNINGTON *et al.*, 1993; Stork *et al.*, 1998). Subsequently, the work of ADELMANN *et al.* (1995) reported that the epitope with 21 amino acids at MOG position 35-55 was recognized by the immune system. The C57BL/6 strain was susceptible to the peptide MOG35-55 and the appearance of clinical manifestations occurred from the 14th day after induction, presenting a chronic evolution and inflammation mediated by T, B cells and macrophages in the central nervous system (BERNARD *et al.*, 1997). The leukocyte adhesion to the cerebral microvasculature that occurs on the 14th day after induction correlates with the clinical findings, since this mechanism is involved in cell migration to the central nervous system, with the participation of the chemokines CCL2 and CCL5 (DOS SANTOS *et al.*, 2005).

In the scope of clinical manifestations, due to the preferential attack of the spinal cord, animals affected by experimental autoimmune encephalomyelitis course with an ascending pattern of flaccid paralysis involving the tail, hind legs and front paws, with evolution to quadriplegia and death (BATOULIS *et al.* 2011). In the experimental model in question, the genesis of the clinical manifestations is centered on the entry of immune cells into the central nervous system and with the concomitant production and activity of inflammation mediators, factors that contribute to the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. In lesions of the central nervous system, cells such as Th1 and Th17 are able to orchestrate the influx of immune cells via mediator secretion (GLATIGNY; BETTELLI, 2018; VAN KAER *et al.*, 2019). Immune system mediators can be pro-inflammatory or anti-inflammatory, and may, respectively, contribute to disease progression or suppression of the self-reactive immune response (JAHAN-ABAD *et al.*, 2019).



Dendritic cells, infiltrating macrophages, B lymphocytes and resident microglia of the central nervous system can express the MHC class II molecule and the co-stimulatory molecules CD80 and CD86, thus provoking the initiation and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis, in a manner analogous to multiple sclerosis, while CD11c+ cells present themselves as potent APCs, aiding in the proliferative response of T lymphocytes (GOVERMAN, 2009; DONG; YONG, 2019; JURGA; PALECZNA; KUTER, 2020). In experimental autoimmune encephalomyelitis, in particular, it should be noted that dendritic cells and infiltrated macrophages function as more efficient APCs than microglia, resident cells of the central nervous system (WLODARCZYK *et al.*, 2014).

As in the pathogenesis of multiple sclerosis, in experimental autoimmune encephalomyelitis we find CD4+ T cells, specifically IFN- γ secreting Th1 cells and IL-17 secreting Th17 cells, in addition to CD8+ T cells (GOVERMAN, 2009; BECHER; SEGAL, 2011). The production of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ and IL-17) is induced by CD11+ cells (GARBERS *et al.*, 2018). Th1 cells have a pathogenic role in experimental autoimmune encephalomyelitis through the production of IFN- γ in the central nervous system, a crucial cytokine of immuno-stimulation or modulation of Th1 cells (JAHAN-ABAD, 2019). During the activity of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis in the lesions, IFN- γ is found at increased levels, a factor associated with an inflammatory response mediated by IFN- γ -producing Th1 cells (LIBLAU; SINGER; MCDEVITT, 1995). IFN- γ regulates the expansion, activation, homeostasis, and survival of T cells (MILLER; MAHER; Young, 2009). It is also a key player in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by the activation of macrophages, increased leukocyte adhesion and release of TNF- α and other cytokines (DEGLIANTONI *et al.*, 1985; BECHER; SPATH; Goverman, 2017). IFN- γ produced by resident microglia and infiltrating monocytes is also responsible for reactivating Th1 and Th17 cells that enter the central nervous system, recruiting CD8+ cells, B lymphocytes and lymph node monocytes to cross the blood-brain barrier (LASSMANN, 2018).

It is also reported in the scientific literature that the adoptive transfer of IL-12p70-polarized T cells to virgin hosts results in autoimmune encephalomyelitis characterized by ascending paralysis associated with macrophage-rich infiltration and up-regulation of the enzyme nitric oxide synthase 2 (NOS2) (KROENKE *et al.*, 2008). IL-12, secreted mostly by antigen-presenting cells, also induces the differentiation of virgin CD4+ T cells into Th1 cells, characterized by the expression of the transcription factor Tbet, responsible for controlling a gene expression program that results in the production of IL-2, IFN- γ and TNF predominantly pro-inflammatory mediators (HAMZA; BARNETT; LI, 2010). During inflammation, such TNF released after stimulation promotes the secretion of other cytokines such as IL-1 β and IL-6 (SFIKAKIS *et al.*, 2010). TNF- α and IL-1 β have similar effects. Both are released by activated T cells and macrophages facilitate the initiation of the local immune reaction. This reaction can produce damage to the vascular endothelium and



permeability of the blood-brain barrier, thus enabling the infiltration of immune cells into the central nervous system. In addition, TNF- α and IL-1 β are also secreted by activated astrocytes and microglia and promote neurodegeneration and demyelination in the central nervous system (CHOI *et al.*, 2014; DONG; YONG, 2019). IL-6 acts on endothelial cells by activating the transcription factor STAT-3, allowing the expression of chemokines and the increase of ICAM-1, recruiting leukocytes to the antigen site, which intensifies inflammation (KISHIMOTO, 2010; HIRANO, 2020). Such a pro-inflammatory cytokine is the main inducer of acute phase liver proteins secreted by neutrophils, monocytes and activated macrophages. (GOAT *et al.*, 2012; SCHMIDT-ARRAS; ROSE-JOHN, 2016). In addition, IL-6 acts on both the innate immune response and the adaptive immune response. In the innate immune response, IL-6 is readily synthesized by myeloid cells, such as macrophages and dendritic cells, after recognition of pathogens through Toll-like receptors (TLRs) at the site of infection or tissue injury. In the adaptive immune response, IL-6 induces the differentiation of B lymphocytes into plasma cells capable of producing antibodies. In combination with TGF- β , IL-6 also promotes the differentiation of Th17 cells, which produce the pro-inflammatory cytokine IL-17 (CIOFANI *et al.*, 2012). Regarding excessive IL-6 production, an increase in the Th17/Treg ratio results in disruption of immune tolerance, leading to autoimmune diseases (KANG *et al.*, 2019; GARBERS *et al.*, 2018). Thus, several therapeutic agents are being evaluated to inhibit the cytokine itself or targets associated with its signaling pathway (GARBERS *et al.*, 2018; KANG *et al.*, 2019). Finally, the cytokine IL-6 is known to be involved in the inflammation of the central nervous system and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis directly, by activating microglia and astrocytes, or indirectly, promoting the differentiation and expansion of Th17 cells (KISHIMOTO, 2010; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018). In mice genetically deficient in IL-6, it was not possible to induce experimental autoimmune encephalomyelitis, thus showing the relevance of IL-6 in the development of the disease (SERADA *et al.*, 2008).

In addition to IL-6, IL-1 and IL-23 promote the differentiation of virgin CD4+ T cells into Th17 cells, and IL-23 may be the most important for the proliferation and maintenance of Th17 cells, whose development is dependent on the transcription factors ROR γ t and STAT3 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Currently, it is known that, after the adoptive transfer of IL-23-polarized T cells to virgin hosts, autoimmune encephalomyelitis is identified with a clinical picture of ascending paralysis associated with neutrophil-rich lesions and granulocytic colony-stimulating factor (G-CSF), which reveals the role of IL-23 in the pathophysiology of the model (KROENKE *et al.*, 2008). TGF- β , an anti-inflammatory cytokine, in the presence of inflammation mediators such as IL-1 and IL-6, also induces the formation of Th17 cells, with an inflammatory character (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).



The actions of Th17 cells are primarily controlled by IL-17, with the aid of interleukin-22 (IL-22) and interleukin-21 (IL-21). IL-17 stimulates the generation of neutrophils through the production of granulocytic colony-stimulating factor (G-CSF), in addition to mediating the recruitment of neutrophils and monocytes, as well as the production of antimicrobial substances (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Although its mechanisms of action in central nervous system inflammation are not elucidated, it is known that IL-17 is essential in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (KANG *et al.*, 2010). IL-22, in turn, also secreted by NK cells and innate lymphoid cells, acts in the maintenance of epithelial integrity, although it contributes to inflammation through epithelial production of chemokines, and may be involved in tissue injury. Finally, IL-21, produced by activated TCD4+ cells, activates B cells in the germ centers, induces the differentiation of Th17 cells and amplifies the proliferation, differentiation and effector function of NK cells and CD8+ T cells (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

The relevance of regulatory T cells (Treg cells) in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis is also highlighted, considering that the adoptive transfer of Treg cells from control mice to mice induced by MOG or PLP prevents the onset and progression of the disease (KOHM *et al.*, 2002). Such lymphocytes are considered a subset of TCD4+ cells that is responsible for modulating immunity, maintaining tolerance against autoantigens, and preventing autoimmunity. They are formed after recognition of their own antigens in the thymus and peripheral lymphoid organs. These regulatory lymphocytes, if they come from the thymus, are called natural Treg cells, and if they come from peripheral lymphoid organs, they are called adaptive or inducible Treg cells. Natural Treg cells express CD4 and CD25 coreceptors and have development and immunotolerance dependent on the nuclear transcription factor Foxp3. Such regulatory lymphocytes of CD4+CD25+FOXP3+ profile are producers of IL-10, whose action is anti-inflammatory (ADEEGBE *et al.*, 2006; DARGAHI *et al.*, 2017). IL-10 is a cytokine involved in modulating innate and adaptive immunity and is an interleukin secreted by subtype 2 helper T cells (Th2 cells) (TRINCHIERI, 2007), although other immune cells are able to secrete it (SUN *et al.*, 2021). Previous studies show the importance of IL-10 action in the control of experimental autoimmune encephalomyelitis, due to its immunoregulatory effect. IL-10 inhibits the production of a wide variety of inflammation mediators produced by T cells, affecting antigen presentation and co-stimulation mediated by antigen-presenting cells, which are critical to the cellular immune response, thus increasing IL-10 leads to a significant reduction in disease severity (BAI *et al.*, 2018). IL-12 and TNF are examples of pro-inflammatory cytokines inhibited by the anti-inflammatory activity of the cytokine IL-10 (KWILASZ *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2021).

In summary, it is recognized that the mechanism of myelin destruction in experimental autoimmune encephalomyelitis is the Th1-profile immune response, involving CD4+ and CD8+ T lymphocytes, activated macrophages, and antimyelin antibodies that activate complement and promote



phagocytosis via opsonization (ZIEMSEN; ZIEMSEN, 2005). Th17 cells, on the other hand, represent an essential link to the neurodegenerative processes found in experimental autoimmune encephalomyelitis, considering that, in neuroectodermal cells (neurons, astrocytes and oligodendrocytes), the deletion of Act1, a crucial component in IL-17 signaling, results in attenuation of the severity of the disease, and that, in Act1-deficient mice, Th17 cells, despite maintaining the ability to infiltrate the central nervous system, fail to recruit lymphocytes, macrophages and neutrophils (KANG *et al.*, 2010).

In this chapter, we review the historical context, definition, etiology, pathophysiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment of multiple sclerosis, an autoimmune disease whose impact on the quality of life of the sick is profound. In parallel, we address aspects about the timeline, induction, evolutionary course and immunogenesis of the most studied model for the investigation of the nuances of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, correlating the similarities and differences between both.

Clearly, it is noted that the advances attributed to the experimental autoimmune encephalomyelitis models for science are clear and have enabled the knowledge of the immunopathogenesis of multiple sclerosis, in addition to enabling the development of treatments for the disease. However, experimental autoimmune encephalomyelitis models are not without limitations. Previous studies have shown in histopathological analysis the presence of infiltrates in the spinal cord and brain of sick animals (PIAO *et al.*, 2007; AHARONI *et al.*, 2021). However, many classical experimental models affect the spinal cord but not the brain, in addition to being centered on CD4+ T cells, while today the substantiality of CD8+ T cells in autoimmunity-mediated inflammation of the central nervous system is already recognized. It is also common for the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis to result in extensive tissue injury (including neurons and axons), rather than just demyelination. Finally, unfortunately, there is still a lack of experimental models representative of the PP phenotype of multiple sclerosis (LINKER; LEE, 2009). Therefore, it is essential to improve the models of experimental autoimmune encephalomyelitis, in order to provide an even more reliable approach to multiple sclerosis with regard to pathophysiology, histopathology, forms of presentation and clinical presentations, so that, then, scientific investigations are safer and more accurate.



REFERENCES

- ABBAS, A. K. LICHTMAN, A. H. PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9 ed. GEN Guanabara Koogan, 2019.
- ABREU, P. *et al.* Esclerose Múltipla: epidemiologia, etiopatogenia, fisiopatologia e diagnóstico diferencial Multiple Sclerosis epidemiology, etiopathogenesis, physiopathology and differential diagnosis. **Sociedade Portuguesa de Neurologia**, v. 2, n. 1, p. 5-14, nov. 2012.
- ADEEGBE, D. *et al.* Cutting Edge: Allogeneic CD4+CD25+Foxp3+ T Regulatory Cells Suppress Autoimmunity while Establishing Transplantation Tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 12, p. 7149–7153, 2 jun. 2006.
- ADELMANN, M. *et al.* The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. **Journal of Neuroimmunology**, v. 63, n. 1, p. 17–27, dez. 1995.
- AHARONI, R. *et al.* Titration of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) - induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. **Journal of Neuroscience Methods**, p. 108999, mar. 2021.
- AITKEN, M. *et al.* Medicines Use and Spending in the U.S.: A Review of 2015 and Outlook to 2020. Tampa: **Institute for Healthcare Informatics**, 2016.
- ALONSO, A. HERNÁN, M. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. **Neurology**, v. 71, n. 129, p. 129, 2008.
- AL-OMAISHI, J. BASHIR, R. GENDELMAN, H. E. The cellular immunology of multiple sclerosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 4, p. 444-452, 1999.
- ANDLAUER, T. F. M. *et al.* Novel multiple sclerosis susceptibility loci implicated in epigenetic regulation. **Science Advances**, v. 2, n. 6, 3 jun. 2016.
- ARRAMBIDE, G. TINTORE, M.; MONTALBAN, X. Oligoclonal bands do not represent dissemination in time in the 2017 revisions to the McDonald criteria. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 25, n. 12, p. 1690–1691, 16 maio 2019.
- ASCHERIO, A. MUNGER, K. L. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. **Seminars in neurology**, v. 36, n. 2, p. 103-14, Abr 2016.
- BAI, X.-Y. *et al.* Tetramethylpyrazine ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating the inflammatory response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 3, p. 1968–1972, set. 2018.
- BARBUGIANI, L. H. S. Os limites ao comércio de produtos farmacêuticos. **Revista de Direito Sanitário**, v. 15, p. 126, 2015.
- BAR-OR, A. LI, R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. **The Lancet Neurology**, v. 20, n. 6, p. 470–483, jun. 2021.
- BATOULIS, H. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis – achievements and prospective advances. **Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica**, v. 119, p. 819-830, 2011.



BAXTER, D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. **Occupational Medicine**, v. 57, n. 8, p. 552–556, 28 nov. 2007.

BAYER. BAYER S.A. Betaferon® beta interferon 1b, 2016. Bula de remédio.

BECHER, B. SEGAL, B. M. TH17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 6, p. 707–712, dez. 2011

BECHER, B. SPATH, S. GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nat Rev Immunol** v. 17, p. 49–59, 2017.

BERNARD, C. C. A. *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 75, p. 77–88, 1997.

BIERHANSL, L. *et al.* Thinking outside the box: non-canonical targets in multiple sclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 8, p. 578–600, 6 jun. 2022.

BIOGEN. Brasil Produtos Farmacêuticos Ltda. AVONEX® betainterferona 1, 2017. Bula de remédio.

BIOGEN. Brasil Produtos Farmacêuticos Ltda. TYSABRI® natalizumabe, 2018. Bula de remédio.

BIRMPILI, D. *et al.* The Translatability of Multiple Sclerosis Animal Models for Biomarkers Discovery and Their Clinical Use. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11532, 29 set. 2022.

BJELOBABA, I. *et al.* Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuro Res**, p. 1-22, 2018.

BLOZIK, E. *et al.* Epidemiology and costs of multiple sclerosis in Switzerland: an analysis of health-care claims data, 2011–2015. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v.1, n. 13, p. 2737-2745, 2017.

BODE, J. G. *et al.* Hepatic acute phase proteins – Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 6-7, p. 496–505, jun. 2012.

BRAIN, R. Dickensian diagnoses. **BMJ**, v. 2, p. 1553, 1955.

BRASIL. Adesão ao tratamento para esclerose múltipla com terapias de primeira linha: análise longitudinal retrospectiva. **Jornal de Assistência Farmacêutica e Farmacoeconomia**, 2017.

BRASIL. Ministérios da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos em Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla**. Brasília, 2021.

BRUCK, W. *et al.* Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. **Annals of Neurology**, v. 38, n. 5, p. 788–796, 1995.

BUTCHER, M. J. ZHU, J. Plasticity and functionality of Th17 subsets in EAE. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 1 supl., p. 163.20–163.20, mai. 2018.

CANTO, E. OKSENBERG, J. R. Multiple sclerosis genetics. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 24, n. 1, p. 75-79, Jan 2018.

CHARCOT, J. M. Oeuvres complètes de J.-M. Charcot. Leçons sur les maladies du système nerveux recueillies et publiées par Bourneville, Tome 1. Paris: **Bureau du Progres Medical and A Delahaye**, 1886.



CHENG, W. CHEN, G. Chemokines and Chemokine Receptors in Multiple Sclerosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

CHOI, S. S. *et al.* Human Astrocytes: Secretome Profiles of Cytokines and Chemokines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e92325, 1 abr. 2014.

CIOFANI, M. *et al.* A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification. **Cell**, v. 151, n. 2, p. 289–303, out. 2012.

COETZEE, T. THOMPSON, A. J. Atlas of MS 2020: Informing global policy change. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1807–1808, 11 nov. 2020.

COMPSTON, A. COLES, A. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1502–1517, 2008.

CONTARINI, G. GIUSTI, P. SKAPER, S. D. Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice. **Neurotrophic Factors**, p. 353–360, 9 dez. 2017.

CORREALE, J. FAREZ, M. F. Smoking worsens multiple sclerosis prognosis: two different pathways are involved. **Journal of Neuroimmunology**, v. 281, p. 23–34, abr. 2015.

DARGAHI, N. *et al.* Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. **Brain sciences**, v. 7, n. 7, p. 78, 2017.

DEGLIANTONI, G. *et al.* Inhibition of bone marrow colony formation by human natural killer cells and by natural killer cell-derived colony-inhibiting activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 161, n. 5, p. 1152–1168, 1 maio 1985.

DENDROU, C. A. FUGGER, L. FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 7 ago. 2015.

DE ROSBO N. K. MENDEL, I. BEN-NUN, A. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. **Journal of Immunology**, v. 25, p. 985–993, 1995.

DIAS, D. S. *et al.* Copaiba oil suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57Bl/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Molecules**, v. 19, p. 12814–12826, 2014.

DONG, Y. YONG, V. W. When encephalitogenic T cells collaborate with microglia in multiple sclerosis. **Nature reviews. Neurology**, v. 15, p. 704–717, 2019.

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

DUFFY, S. S. LEES, J. G; MOALEM-TAYLOR, G. The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis International**, 2014.

ELICES, M. J. *et al.* VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. **Cell Amsterdam**, v. 60, p. 577–584, 1990.



- ENGELHARDT, B. KAPPOS, L. Natalizumab: Targeting $\alpha 4$ -Integrins in Multiple Sclerosis. *Neurodegenerative Diseases*, v. 5, p. 16–22, 2008.
- EPPS, H. L. V. Thomas Rivers and the EAE model. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005.
- FERRE, L. *et al.* Basal vitamin D levels and disease activity in multiple sclerosis patients treated with fingolimod. *Neurological Sciences*, v. 39, n. 8, p. 1467-1470, ago. 2018.
- FILIPPI, M. ROCCA, M. A. Multiple Sclerosis. *White Matter Diseases*, p. 1–35, 2020.
- FONTES, L. B. A. *et al.* Immunomodulatory effects of licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 66, p. 886–894, 2014.
- FONTES, L. B. A. *et al.* β -Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 91, p. 257-264, 2017.
- FRAGOSO, Y. D. ELSO, F. G. CARRA, A. Differential diagnosis of multiple sclerosis in Latin America. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. v. 3, n. 3, p. 2055217317714279, Jul-Sep 2017.
- FRANKLIN, R. J. M. FFRENCH-CONSTANT, C. Remyelination in the CNS: From biology to therapy. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, n. 11, p. 839–855, 2008.
- FRISULLO, G. *et al.* Circulating CD8+CD56–perforin+ T cells are increased in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, v. 240-241, p. 137–141, dez. 2011.
- FROHMAN, E. M.; RACKE, M. K.; RAINE, C. S. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis. *Journal of Medicine*, v. 354, n. 9, p. 942–955, 2006.
- GAJOFATTO, A. BENEDETTI, M. D. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop. *World Journal of Clinical Cases*, v. 3, p. 545, 2015.
- GANDRA, A. Governo distribui medicação de alto custo para esclerose múltipla. *Agência Brasil*, 2019.
- GARBERS, C. *et al.* Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 6, p. 395–412, 4 maio 2018.
- GENZYME A SANOFI COMPANY. AUBAGIO® teriflunomida. 2016.
- GHOLAMZAD, M. *et al.* A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflammation Research*, v. 68, n. 1, p. 25–38, 3 set. 2018.
- GLATIGNY, S. BETTELLI, E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 11, p. a028977, 8 jan. 2018.
- GONSETTE, R. E. Self-tolerance in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Belgica*, v. 112, n. 2, p. 133–140, 24 mar. 2012.
- GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 6, p. 393-407, jun. 2009.



HAAS, J. *et al.* Prevalence of Newly Generated Naive Regulatory T Cells (Treg) Is Critical for Treg Suppressive Function and Determines Treg Dysfunction in Multiple Sclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1322–1330, 15 jul. 2007.

HAMZA, T. BARNETT, J. B. LI, B. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 3, p. 789–806, 26 fev. 2010.

HARTUNG, H.-P. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: revisions of the McDonald criteria 2017 - continuity and change. **Current opinion in neurology**, v. 32, n. 3, p. 327–337, 2019.

HASSELMANN, J. P. C. *et al.* Consistent induction of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice for the longitudinal study of pathology and repair. **Journal of neuroscience methods**, v. 284, p. 71–84, 1 jun. 2017.

HAUSER, S. L. CREE, B. A. C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 12, p. 1380-1390.e2, dez. 2020.

HELLINGS, N. *et al.* T-Cell Reactivity to Multiple Myelin Antigens in Multiple Sclerosis Patients and Healthy Controls. **Journal of Neuroscience Research**, v. 63, n. 3, p. 203-302, 2001.

HIRANO, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **International Immunology**, v. 33, n. 3, p. 127–148, 18 dez. 2020.

HORGA, A. TINTORÉ, M. Natalizumab for relapsing-remitting multiple sclerosis. **Neurologia**, v. 2011, p. 357–368, 2011.

HUNTEMANN, N. *et al.* An optimized and validated protocol for inducing chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6J mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 367, p. 109443, fev. 2022.

IFERGAN, I. *et al.* The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 131, n. Pt 3, p. 785–799, 1 mar. 2008.

JAHAN-ABAD, A. J. *et al.* Serum pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neuropathology**, 10 nov. 2019.

JAKIMOVSKI, D. *et al.* Lifestyle-based modifiable risk factors in multiple sclerosis: review of experimental and clinical findings. **Neurodegenerative Disease Management**, v. 9, n. 3, p. 149–172, jun. 2019.

JONES, J. L. COLES, A. New treatment strategies in multiple sclerosis. **Experimental Neurology**, v. 225, p. 34–39, 2010.

JURGA, A. M. PALECZNA, M. KUTER, K. Z. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, 6 ago. 2020.

KANG, S. *et al.* Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 1007–1023, abr. 2019.

KANG, Z. *et al.* Astrocyte-Restricted Ablation of Interleukin-17-Induced Act1-Mediated Signaling Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis. **Immunity**, v. 32, p. 414-425, 2010.

KIPP, M. *et al.* Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. **Brain pathology**, v. 27, n. 2, p. 123–137, 2017.



KISHIMOTO, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. **International Immunology**, v. 22, n. 5, p. 347–352, 21 abr. 2010.

KLEFBECK, B. NEDJAD, J. Effect of inspiratory muscle training in patients with multiple sclerosis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 84, n. 7, p. 994–999, 2003.

KLOTZ, L. *et al.* Teriflunomide treatment for multiple sclerosis modulates T cell mitochondrial respiration with affinity-dependent effects. **Science Translational Medicine**, v. 11, 2019.

KNUTH, A. K. *et al.* Interferons Transcriptionally Up-Regulate MLKL Expression in Cancer Cells. **Neoplasia**, p. 74–81, 2019.

KOBELT, G. *et al.* Burden and cost of multiple sclerosis in Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0208837, 23 jan. 2019.

KOCH-HENRIKSEN, N. SØRENSEN, P. S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **Lancet Neurology**, v. 9, p. 5, 2010.

KOHN, A. P. *et al.* Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 4712–4716, 1 nov. 2002.

KORNBERG, M. D. *et al.* Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity. **Science**, v. 360, p. 449–453, 2018.

KROENKE, M. A. *et al.* IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. **J Exp Med**, v. 205, n. 7, p. 1535–1541, 2008.

KROEPFL, J. F. *et al.* Investigation of Myelin/Oligodendrocyte Glycoprotein Membrane Topology. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 5, p. 2219–2222, 23 nov. 2002.

KWILASZ, A. J. *et al.* The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 55–69, set. 2015.

KYRAN, E. L. *et al.* Multiple pathological mechanisms contribute to hippocampal damage in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. **NeuroReport**, v. 29, n. 1, p. 19–24, 3 jan. 2018.

LALIVE, P. H. *et al.* Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 103(7), p. 2280–2285, 2006.

LANDTBLOM, A. *et al.* O primeiro caso clínico de esclerose múltipla: Augustus d'Este (1794–1848). **Neurological Sciences**, v. 31, p. 29–33, 2010.

LASSMANN, H. Multiple Sclerosis Pathology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 3, p. a028936, 22 jan. 2018.

LASSMANN, H. Targets of therapy in progressive MS. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 23, n. 12, p. 1593–1599, out. 2017.



LEBRUN-FRENAY, C. *et al.* Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event. *Annals of Neurology*, v. 88, n. 2, p. 407–417, 29 jun. 2020.

LIBLAU, R. S. SINGER, S. M. MCDEVITT, H. O. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology Today*, v. 16, n. 1, p. 34–38, jan. 1995.

LININGTON, C. *et al.* Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *Journal of Neuroimmunology*, v. 40, n. 2-3, p. 219–224, out. 1992.

LININGTON, C. *et al.* T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *European Journal of Immunology*, v. 23, n. 6, p. 1364–1372, jun. 1993.

LINKER, R. A. LEE, D-H. Models of autoimmune demyelination in the central nervous system: on the way to translational medicine. *Exp Transl Stroke Med*, v. 1, n. 5, 2009.

LINNINGTON, C. WEBB, M. WOODHAMS, P. L. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *Journal of Neuroimmunology*, v. 6, n. 6, p. 387–396, set. 1984.

LO, L. M. P. *et al.* Estimar a contribuição relativa das comorbidades na previsão da qualidade de vida relacionada à saúde de pessoas com esclerose múltipla. *Journal of Neurology*, v. 268, p. 569–581, 2021.

LOPES, E. R. *et al.* Bogliolo Patologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

LUBLIN, F. D. *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*, v. 83, n. 3, p. 278–286, 28 maio 2014.

LUCCHINETTI, C. *et al.* Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, v. 47, p. 707–717, 2000.

LUTTEROTTI, A. BERGER, T.; REINDL, M. Biological markers for multiple sclerosis. *Current Medicinal Chemistry*, 2007.

MARTIN, R. MCFARLAND, H. F. MCFARLIN, D. E. Immunological Aspects of Demyelinating Diseases. *Annual Review of Immunology*, v. 10, n. 1, p. 153-187, 1992.

MASVEKAR, R. *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers link toxic astrogliosis and microglial activation to multiple sclerosis severity. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v. 28, p. 34–43, fev. 2019.

MCDONALD, W. I. *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, v. 50, n. 1, p. 121–127, 2001.

MCGINLEY, A. M. *et al.* Th17 cells, $\gamma\delta$ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity*, v. 87, p. 97–108, fev. 2018.

MILLER, C. H. T. MAHER, S. G. YOUNG, H. A. Clinical Use of Interferon- γ . *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1182, p. 69–79, 1 dez. 2009.

MILLER, S. D. KARPUS, W. J. DAVIDSON, T. S. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Curr Protoc Immunol*, 2007.



MILO, R. MILLER, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, v. 13, n. 4–5, p. 518–524, 2014.

MILOVANOVIC, J. *et al.* Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 3 jun. 2020.

MOJAVERROSTAMI, S. *et al.* A Review of Herbal Therapy in Multiple Sclerosis. *Adv Pharm Bull. Pharm Bulletin*, 2018.

MOUSIANAS, L. *et al.* Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*, 47, n. 10, p. 1107–1113, 2015.

MUNGER, K. L. *et al.* Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *JAMA*, v. 296, n. 23, p. 2832, 20 dez. 2006.

NARAZAKI, M. KISHIMOTO, T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 11, p. 3528, 9 nov. 2018.

NOURBAKHSH, B. MOWRY, E. M. Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, v. 25, n. 3, p. 596–610, jun. 2019.

NOVARTIS. Biociências LTDA. GILENYA® cloridrato de fingolimode, 2015. Bula de remédio.
NOVO, A. M. BATISTA, S. Multiple Sclerosis: Implications of Obesity in Neuroinflammation. *Adv Neurobiol*. v. 19, p. 191-210, 2017.

OLECHOWSKI, C. J. *et al.* A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain*, v. 149, n. 3, p. 565–572, jun. 2010.

OLIVEIRA, E. M. L. SOUZA, N. A. Esclerose Múltipla. *Rev. Neurociências*, v. 6, n. 3, p. 114-118, 1998.

PASSOS, G. R. D. *et al.* Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Mediators of Inflammation*, v. 2016, p. 1–11, 2016.

PEREIRA, A. B. C. N. G. *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v. 4, p. 572–579, 2015.

PEREIRA, D. S. N. B. *et al.* Animais como modelos experimentais nos cursos de graduação na área da saúde: revisão sistemática. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 2020.

PETZOLD, A. Neurite óptica: outro diagnóstico de Dickens. *Neuro - Ophthalmology*, p. 247– 50, 2013.

PIAO, W.-H. *et al.* Therapeutic Effect of Anthracene-Based Anticancer Agent Ethonafide in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 11, p. 7415– 7423, 1 dez. 2007.

PICCIO, L. *et al.* Molecular Mechanisms Involved in Lymphocyte Recruitment in Inflamed Brain Microvessels: Critical Roles for P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 and Heterotrimeric Gi-Linked Receptors. *Journal of Immunology*, v. 168, n. 4, p. 1940–1949, 2002.



PLATTEN, M. STEINMAN, L. Anti-inflammatory strategies for the treatment of multiple sclerosis – tryptophan catabolites may hold the key. Amsterdam: **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 33, p. 401–408, 2006.

RACKE, M. K. LOVETT-RACKE, A. E. Glatiramer Acetate Treatment of Multiple Sclerosis: An Immunological Perspective. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 4, p. 1887–1890, 15 fev. 2011.

REDER, A. T. FENG, X. How Type I Interferons Work in Multiple Sclerosis and Other Diseases: Some Unexpected Mechanisms. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 34, p. 589–599, 2014.

REDFERN, J. S. Immunopathophysiologic basis of multiple sclerosis and implications for therapy – a narrative review. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 9, n. 6, p. 263–271, 21 dez. 2021.

REZENDE, P. A. ARRUDA, W. O. Imunopatologia da Esclerose Múltipla. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 34, n. 3, p. 97-103, jun. 1998.

ROBINSON, A. P. *et al.* Chapter 8 - The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. In: GOODING, D. S. *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, v. 122, p. 173-189, 2014.

SALAZAR, I. L. *et al.* Posttranslational modifications of proteins are key features in the identification of CSF biomarkers of multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, 8 fev. 2022.

SCHULZE-TOPPHOFF, U. *et al.* Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, p. 4777–4782, 2016.

SCOLDING, N. J. FRANKLIN, R. J. M. Axon loss in multiple sclerosis. **Lancet**, v. 352, p. 340-341, 1998.

SCHMIDT-ARRAS, D. ROSE-JOHN, S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1403–1415, jun. 2016.

SERADA, S. *et al.* IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9041–9046, jul. 2008.

SFIKAKIS, P. P. *et al.* A primeira década de antagonistas biológicos do TNF na prática clínica: lições aprendidas, questões não resolvidas e orientações futuras, 2010.

SILVA, A. K. G. DE PAULA, M. L. FERREIRA, A. P. Imunopatologia da encefalomielite auto-imune experimental murina mediada por linfócitos T. Juiz de Fora: **HU Revista**, v. 34, n. 3, p. 205-212, 2008.

SILVA, N. L. *et al.* Cost analysis of multiple sclerosis in Brazil: a cross-sectional multicenter study. **Bmc Health Services Research**, v. 16, p. 102–124, 2016.

SIMPSON, S. *et al.* Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 90, n. 11, p. 1193–1200, 19 jun. 2019.



SLOANE, E. LEDEBOER, A. Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental Multiple Sclerosis: MOGEAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine gene therapy. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2009.

SPENCER, C. M. *et al.* Reduction of CD8(+) T lymphocytes in multiple sclerosis patients treated with dimethyl fumarate. **Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 2, 2015.

SOBIERA, D. M. Fingolimod: A potential first-in-class oral therapy for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. North Olmsted: **Formulary**, v. 45, ed. 8, p. 245-251, 2010.

SOLLID, L. M. Epstein-Barr virus as a driver of multiple sclerosis. **Science Immunology**, v. 7, n. 70, abr. 2022.

SOLOMON, A. J. Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 3, p. 611–635, jun. 2019.

SOSPEDRA, M. MARTIN, R. IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 683–747, abr. 2005.

STEFFERL, A. *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the “resistant” Brown-Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. **J Immunol**, v. 163, n. 1, p. 40-9, 1999.

STORK, M. K. *et al.* Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. **Brain Pathology**, v. 8, p. 681–694, 1998.

SUN, H. *et al.* IL-10-Producing ILCs: Molecular Mechanisms and Disease Relevance. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 29 mar. 2021.

SWANBORG, R. H. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 77, n.1, p. 4-13, 1995.

TABANSKY, I. *et al.* Advancing drug delivery systems for the treatment of multiple sclerosis. **Immunologic Research**, v. 63, p. 58–69, 2015.

TEVA. TEVA Pharmaceuticals LTDA. COPAXONE (acetato de glatirâmer) ®, 2014. Bula de remédio.

THOMPSON, A. J. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 2, p. 162–173, fev. 2018.

TOBORE, O. T. Oxidative/Nitroxidative Stress and Multiple Sclerosis. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, p. 506–514, 2021.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self-control. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 239–243, 12 fev. 2007.

UNPHRED, D. A. **Reabilitação neurológica**. São Paulo: Manole, 2004.

VAN KAER, L. *et al.* Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 16, n. 6, p. 531–539, 15 mar. 2019.

VIEGAS, F. C. S. **Estudo clínico-histopatológico da encefalomielite auto-imune experimental em camundongos selvagens e deficientes para a apolipoproteína-E**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.



VOLPI, C. *et al.* Preclinical discovery and development of fingolimod for the treatment of multiple sclerosis. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p. 1199–1212, 2019.

WALTON, C. *et al.* Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1816–1821, 11 nov. 2020.

WAUBANT, E. *et al.* Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 6, n. 9, p. 1905–1922, 7 ago. 2019.

WILLENBORG, D. O. Experimental Allergic Encephalomyelitis in the Lewis Rat: Studies on the Mechanism of Recovery from Disease and Acquired Resistance to Reinduction. **J Immunol**, v. 123, n. 3, p. 1145–1150, 1979.

WILLER, C. J. *et al.* Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 22, p. 12877–12882, 20 out. 2003.

WLODARCZYK, A. *et al.* Comparison of microglia and infiltrating CD11c+ cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, 25 mar. 2014.

WUCHERPFENNIG, K. W. *et al.* Structural alterations in peptide–MHC recognition by selfreactive T cell receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 6, p. 590–595, dez. 2009.

YANG, J. **Peripheral Immune Response in Chronic Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in SJL mice**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Neurociência) – Universidade de Helsinki, Finlândia, 2003.

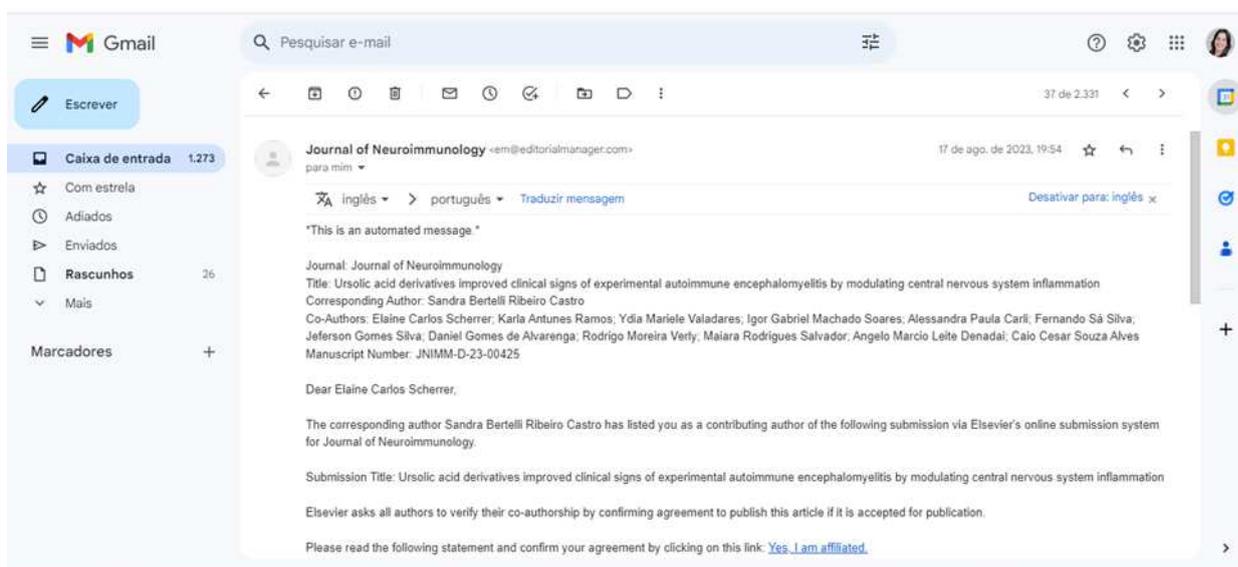
YIN, Y. *et al.* Structure of a TCR with high affinity for self-antigen reveals basis for escape from negative selection. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 6, p. 1137–1148, 4 fev. 2011.

ZAGON, I. S. MCLAUGHLIN, P. J. **Multiple sclerosis: perspectives in treatment and pathogenesis**. Brisbane, Australia: Codon Publications, 2017.

ZETTERBERG, H. Fluid biomarkers for microglial activation and axonal injury in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 136, p. 15–17, 25 out. 2017.

ZIEMSEN, T. ZIEMSEN, F. The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 7, p. 460–7, 2005.

ANEXO E - Submissão de artigo



Ursolic acid derivatives improved clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating central nervous system inflammation

Elaine Carlos Scherrer,^a Karla Antunes Ramos,^b Ydia Mariele Valadares,^a Igor Gabriel Machado Soares,^b Alessandra Paula Carli,^b Fernando Sá Silva,^a Jeferson Gomes Silva,^a Daniel Gomes de Alvarenga,^a Rodrigo Moreira Verly,^c Maiara Rodrigues Salvador,^a Angelo Marcio Leite Denadai,^a Caio César Souza Alves,^b Sandra Bertelli Ribeiro Castro,^{b*}

a Life Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brazil.

b Faculty of Medicine, Federal University of the Valleys of Jequitinhonha and Mucuri, Teófilo Otoni, MG, Brazil.

c Department of Chemistry, Federal University of the Valleys of Jequitinhonha and Mucuri, Diamantina, MG, Brazil.

*Corresponding author: Sandra Bertelli Ribeiro de Castro – bertelli.ribeiro@ufvjm.edu.br

Abstract

The immunopathogenesis of multiple sclerosis involves the activation of T lymphocytes, leading to progressive axonal loss and brain atrophy. Ursolic acid is widely used as herbal medicine, which has the ability to inhibit cytokine production and secretion and can influence the differentiation of CD4+ helper cells. Thus, the immunomodulatory effects of ursolic acid derivatives (AUD1 and AUD2) were evaluated. AUD1 and AUD2 modulated the cellular profile and inflammatory mediators and reduced the presence of inflammatory infiltrates and demyelination in the central nervous system. In conclusion, AUD1 and AUD2 derivatives promoted an improvement in the clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis.

Keywords: Multiple sclerosis; Treg cells; antigen-presenting cell; demyelination; triterpene

Abbreviations: Multiple sclerosis (MS), experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), ursolic acid (AU), Methyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate (AUD1), Methyl 3 β -acetoxy-11-oxours-12-en-28-oate (AUD2), central nervous system (CNS), Antigen presenting cell (APC).

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by demyelination, gliosis and axonal degeneration of the central nervous system (CNS) (Reich et al., 2018). The immunopathogenesis of MS involves activation of T and B lymphocytes that act against CNS antigens, leading to progressive axonal loss, brain atrophy, and neurological and cognitive impairment (Bierhansl et al., 2022). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) has been widely employed to evaluate new strategies for the treatment of MS, due to the immunological correlation between MS and EAE (Constantinescu et al., 2011; Jahan-Abad et al., 2019).

Ursolic acid (AU) is a pentacyclic triterpenoid compound found naturally in fruit peels as well as in various herbs and spices (Kashyap et al., 2016; Seo et al., 2018; Gudoityte et al., 2021). Widely used as an herbal medicine, AU exhibit a broad spectrum of pharmacological activities (Lee et al., 2016; Hussain et al., 2017), being notable for its anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Researches have shown that AU has the ability to inhibit the production and secretion of cytokines from immune cells, such as T cells, B cells or macrophages (Ahmad et al., 2006; Checker et al., 2012; Rong et al., 2022). In addition, the AU may influence the differentiation of CD4⁺ helper cells (Xu et al., 2011).

Xu et al. (2011) demonstrated that AU reduced the clinical signs of EAE by inhibiting Th17 cell differentiation. Baek et al. (2014) reported that AU inhibited Th17 cell differentiation in autoimmune arthritis, accompanied by decreased expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-21 and IL-17). Additionally, Xu et al. (2022) reinforced that AU inhibited Th17 cell differentiation by repressing the STAT3/ROR γ t signaling pathway. Zhang et al. (2020) observed that AU reduced EAE severity and improved clinical recovery in the early, peak and chronic phases of the disease by reducing the number of Th1 and Th17 cells. These findings highlight the potential of UA as a possible therapeutic agent for autoimmune diseases, due its immunomodulatory properties in regulating inflammatory responses.

In the present study, the immunomodulatory effects of the ursolic acid derivatives (AUD1 and AUD2) in the experimental autoimmune encephalomyelitis model were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Ursolic acid and derivatives

Ursolic acid was in analytical grade (Merck, Darmstadt, Germany). The semisynthetic derivatives Methyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate (AUD1) and Methyl 3 β -acetoxyurs-12-en-28-oate (AUD2) were previously synthesized and kindly ceded by Dr. Ydia Valadares. The synthesis and spectral characteristics of the derivatives were previously published by Scherrer et al. (2019).

2.2 Animals

C57/BL6 female mice (n=14/group), 8 weeks old, from the animal facility of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) were used. The animals were randomly housed in appropriate polypropylene cages and kept at a constant temperature 22-23 °C, with free access to feed and water, at the animal house of the Faculty of Medicine, Federal University of the Valleys of Jequitinhonha and Mucuri, Teófilo Otoni, MG, Brazil. All protocols were performed responsibly according to ethical principles regarding the use of animals in experiments, approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA)-UFVJM (No. 04/2019R).

2.3 EAE Induction

Each induced animal was immunized subcutaneously (s.c), on each side of the dorsal region, near the base of the tail, with 100 μ g of MOG₃₅₋₅₅ (GenOne) emulsified in complete Freund's adjuvant (Sigma) in a 1:1 ratio, supplemented with 400 μ g of Mycobacterium tuberculosis - H37 RA (Difco). On the day of immunization and after 48 hours, each animal received 0.3 μ g of pertussis toxin (Sigma) intraperitoneally (i.p.).

2.4 Treatment with Ursolic acid and derivatives (UAD1 and UAD2)

C57BL/6 females were divided into 5 groups: (a) EAE (induced and treated with PBS); (b) AU (induced and treated with ursolic acid); (c) AUD1 (induced and treated with ursolic acid derivative 1); (d) AUD2 (induced and treated with ursolic acid derivative 2);

(e) CN (control not induced and treated with PBS). The treatments were administered i.p.. The AU, AUD1 and AUD2 were given at 50 mg/kg. All treatments were realized daily during 6 days starting from day 15 after EAE induction.

2.5 Clinical Assessment

Mice were weighed daily from the day of induction (day 0) until the day of euthanasia (day 21 after immunization). The animals were also assessed for neurological disability using the scale adapted by De Paula et al. (2008).

2.6 Histological Analysis

The animals were euthanized and perfused with buffered formalin. After that, the spinal cords were excised and fixed in buffered formalin. Cross-sections of the spinal cord, at cervical, thoracic, and lumbar levels, were processed for paraffin perfusion. Sections of 5 μm were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to assess the presence of inflammatory infiltrates. Sections of 10 μm were stained with luxol fast blue for the evaluation of demyelination. Semi-quantitative histological assessment of inflammation and demyelination was scored in a blinded manner by a pathologist using a scale of 0 to 5 based on the approximate percentage of tissue involved with 0 = none, 1= minimal (1-5%), 2 = mild (6-10%), 3= moderate (11-25%), 4= severe (26-50%) and 5= marked (>50%) (Pant et al., 2017).

2.7 Isolation of Cells

Excised brains and inguinal lymph nodes were macerated and filtered using 70 μm cell strainer (BD Biosciences) in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma). Mononuclear cells were collected after a Percoll density gradient centrifugation and washed with staining buffer (PBS, 1% FBS, 0.09% sodium azide). The cell pellet was suspended in ACK solution, centrifuged at 350 Xg for 5 min, and suspended in staining buffer for flow cytometry analysis.

2.8 Flow Cytometry Analysis

Isolated cells were counted in a Neubauer chamber and incubated with anti-mouse CD80-PerCP, MHC-II-APC, CD86-PerCP, CD11c-FITC, CD4-PerCP, and CD8-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) antibodies, as determined by the manufacturer. After 30 minutes of incubation at 4°C, cells were washed with staining buffer, fixation buffer containing paraformaldehyde (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA) and in permeabilization buffer (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA). After extracellular labeling, the cells were subjected to intracellular labeling with anti-mouse IFN- γ -PE-Cy-7, IL-10-PE and IL-17A-Alexa Fluor 488 or Foxp3-Alexa Fluor 488 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Cell capture was performed using the FACSVerse flow cytometer (Becton Dickinson, USA) and analyses were performed with FCS Express version 3.

2.9 Cytokine assays

For the evaluation of cytokine levels, portions of the spinal cords were weighed and macerated in cytokine extraction buffer (100 mg/mL) composed of: 0.4 M NaCl, 0.05% tween 20, 0.5% bovine serum albumin-BSA, 0.1 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride-PMSF, 0.1 M benzethonium chloride-BC, 10 mM ethylene diamino tetraacetic acid-EDTA and 20 pM aprotinin. Then, the material was homogenized and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C and the supernatants were collected. The concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF, IFN- γ in the supernatants were determined by the ELISA method, using commercially available antibodies (BD Biosciences).

2.10 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 software. The results were expressed as mean \pm standard error. Numerical variables were evaluated in the different groups by the Kolgomorov-Smirnov normality test for Gaussian distribution of the data. The Mann-Whitney non-parametric test was used to determine significant differences between the groups of mice, with a significance level of less than 5% ($p < 0.05$).

3. Results

3.1 AUD1 and AUD2 treatment reduced the clinical signs of EAE

The induced mice showed clinical signs with onset at day 12 post-induction and a peak at day 21 (Figure 1A). The AUD1 and AUD2 treated mice showed significant reduction of the clinical signs at day 21 (Figure 1A). No differences were observed in the weight of the animals between the groups (Figure 1B).

3.2 AUD1 and AUD2 reduced inflammatory infiltrates and demyelination

A significant reduction in cellular infiltrate was observed in the spinal cord of AUD1 and AUD2 treated mice when compared to the EAE group (Figure 2A). The longitudinal sections of the spinal cord stained with H&E for the assessment of the presence of inflammatory infiltrate (Figure 2A) and longitudinal sections of the spinal cord stained with luxol fast blue for the assessment of demyelination (Figure 2B). A lower degree of demyelination was also observed after the treatments (Figure 2B). Pathology scores (Figure 2C and 2D) showed that treatments with AUD1 and AUD2 significantly preserve the spinal cord of EAE-induced mice.

3.3 AUD1 and AUD2 changed the number of cells in brain and inguinal lymph nodes

The absolute number of CD11c+MHCII+, CD11c+CD80+, CD11c+CD86+, CD4+, CD8+, CD4+IL-17+, CD4+IFN γ + and CD4+IL-10+FOXP3+ cells were assessed in the inguinal lymph nodes (Figure 4) and brain by flow cytometry (Figure 3). Treatment with AUD1 and AUD2 showed a significant reduction in the numbers of antigen presenting cells and their co-stimulatory molecules in the brain of the animals (Figures 3A, B, C), and also a significant reduction in the number of CD4+ (Figure 3D), CD8+ (Figure 3E), CD4+IL-17+ (Figure 3F), CD4+IFN γ + (Figure 3G) and CD4+IL-10+FOXP3+ (Figure 3H) cells. In the peripheral immune response, the derivatives showed different actions (Figure 4). In mice treated with AUD2, reduced numbers of antigen-presenting cells and their co-stimulatory molecules were also found in the lymph nodes (Figure 4A, B, C) and also reduced numbers of CD4+ (Figure 4D), CD8+ (Figure 4E), CD4+IL-17+ (Figure 4F), CD4+IFN γ + (Figure 4G) and CD4+IL-10+FOXP3+ (Figure 4H) cells, while AUD1 treatment only reduced the absolute number of CD4+ (Figure 4D), CD8+ (Figure 4E) and

CD4+IL-17+ (Figure 4F) cells, and also increased the number of CD4+IL-10+FOXP3+ cells (Figure 4H).

3.4 AUD1 and AUD2 reduced IL-1 β and TNF- α release in the spinal cord

To investigate other molecules in the CNS that would be contributing to the therapeutic effects of AUD1 and AUD2, the levels of cytokines present in the spinal cord were assessed. The results showed that AUD1 and AUD2 treatments reduced the levels of the cytokines IL-1 β (Figure 5A), TNF- α (Figure 5D) and IL-10 (Figure 5F), while there was no effect in the cytokines IL-6 (Figure 5B), IFN- γ (Figure 5E) and IL-12p70 (Figure 5C).

4. Discussion

In the present study it was observed that treatment with AUD2 was the one that showed the best result in inhibiting the clinical signs of EAE, the results demonstrate that this derivative acted by decreasing the number of APCs cells with their co-stimulatory molecules in the periphery, suggesting that this reduction may have contributed to the inhibition of the number of Th1 and Th17 profile cells found in the lymph nodes, as well as in the CNS.

In EAE Th1 and Th17 cells have the ability to orchestrate the influx of inflammatory cells into CNS lesions through the secretion of pro-inflammatory cytokines (Glatigny and Bettelli, 2018; Van Kaer et al., 2019). IL-10-producing TCD4+FOXP3+ cells are also known to be associated with decreased clinical signs in EAE (Dai et al., 2012; Bai et al., 2018). Although Tregs are associated in the improvement of clinical signs in EAE, AUD2 promoted a significant reduction in the clinical signs of treated animals, however, it inhibited IL-10 production in the medulla and further inhibited the number of CD4+IL-10+FOXP3+ cells in the periphery and brain, thus demonstrating that the autoregulation mechanism for AUD2 seems not to be related to CD4+IL-10+FOXP3+ cells. On the other hand, in the periphery, the AUD1 derivative increased the number of CD4+IL-10+FOXP3+ cells. This increase in CD4+IL-10+FOXP3+ cells in the periphery may justify the reduction in the number of IL-17-producing CD4+, CD8+ and CD4+ cells in the lymph nodes by AUD1.

The cytokines IL1- β and TNF- α released by activated T cells and macrophages facilitate the initiation of the local immune reaction. This reaction may produce damage to the

vascular endothelium and increase blood-brain-barrier permeability and consequently facilitate cell infiltration into the CNS. The cytokines IL1- β and TNF- α are also secreted by activated astrocytes and microglia, promoting neurodegeneration and demyelination in the CNS (Choi et al., 2014; Dong and Yong, 2019). In this study, treatments with AUD1 and AUD2 attenuated the concentrations of the cytokines IL1- β and TNF- α in the spinal cord, which may have contributed to the reduction in the number of CD8+, CD4+, CD4+IFN- γ +, CD4+IL-17+ cells found in the CNS.

Moreover, cells expressing CD11c+ present themselves as potent APCs assisting in the proliferative response of T lymphocytes (Dong and Yong, 2019; Jurga et al., 2020). Consistent with the aforementioned data, in the present work it is suggested that AUD1 and AUD2 by reducing the number of APCs and co-stimulatory molecules, inhibited the reactivation of CD4+IL-17+ and CD4+IFN γ + cells in the brain. Also, there is evidence that CD8+ cells contribute to CNS tissue damage in EAE and are also present in the CSF of MS patients (Huseby et al., 2001). In this context, AUD2 by reducing the number of APCs, may have contributed to the reduction in the number of CD8+ cells observed in the lymph nodes and brain.

In addition to modulating the cellular profile and inflammatory mediators, AUD1 and AUD2 treatments also reduced the presence of inflammatory infiltrates and demyelination in the CNS, suggesting a relationship with inhibition of worsening clinical signs. The demyelination in EAE, as in MS, is a result of inflammatory lesions in the CNS that lead to clinical signs (Lassmann, 2018).

The results presented suggest that the mechanisms of action of the derivatives are different. The results obtained in this study show that treatment with the AUD2 derivative improves the clinical signs of EAE by promoting the reduction of APCs and their co-stimulatory molecules and consequently the reduction of CD4+, CD8+ cell activation and also an inhibition in the differentiation of CD4+ cells into Th1 and Th17 profile in the lymph nodes, findings similar to that found by Zhang et al. (2020), using ursolic acid in the treatment of EAE. In turn, AUD1 showed inhibition of the number of CD4+, CD8+ and CD4+Th17+ cells in the periphery and an increase in the number of CD4+IL-10+FOXP3+ regulatory cells, indicating an action of Tregs in its mechanism of action, which was not observed in AUD2 treatment.

Importantly, both treatments were able to reduce the number of Th17 CD4+ cells in the periphery and CNS. Inhibition of Th17 cell activities is known to have significant

implications in the treatment of MS and other immune-related diseases (Tesmer et al., 2008).

In conclusion, AUD1 and AUD2 derivatives promoted a reduction in the clinical signs of EAE by regulating immune cells in the periphery, reducing the number of pro-inflammatory cells in the lymph nodes and their migration to the CNS. However, further research on the mechanisms of action of these derivatives is needed to enable the development of new therapeutic drugs for the treatment of MS and other autoimmune diseases.

Acknowledgments

The authors would like to thank the following Brazilian foundations for financial support. This work was supported in part by Grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (431816/2018-2; CNPQ-NANO 550321/2012-8, 308278/2020-8 and 437418/2018-9), CT-INFRA 2013/FINEP (FINEP 0633/13); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ 02052-21; APQ 02423-18, APQ 02506-22 and APQ 03152-18) Federal University of the Valleys of Jequitinhonha and Mucuri and Federal University of Juiz de Fora.

References

Ahmad, S.F., Khan, B., Bani, S., Suri, K.A., Satti, N.K., Qazi, G.N., 2006. Amelioration of adjuvant-induced arthritis by ursolic acid through altered Th1/Th2 cytokine production. *Pharmacol. Res.* 53, 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.11.005>

Baek, S., Lee, J., Lee, D., Park, M., Lee, J., Kwok, S., Cho, M., Park, S., 2014. Ursolic acid ameliorates autoimmune arthritis via suppression of Th17 and B cell differentiation. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 1177-1187. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.58>

Bai, X.-Y., Wang, X.-F., Zhang, L.-S., Du, P.-C., Cao, Z., Hou, Y., 2018.

Tetramethylpyrazine ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by

- modulating the inflammatory response. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 503, 1968-1972. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.143>
- Bierhansl, L., Hartung, H.-P., Aktas, O., Ruck, T., Roden, M., Meuth, S.G., 2022. Thinking outside the box: non-canonical targets in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21, 578-600. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00477-5>
- Checker, R., Sandur, S.K., Sharma, D., Patwardhan, R.S., Jayakumar, S., Kohli, V., Sethi, G., Aggarwal, B.B., Sainis, K.B., 2012. Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS ONE.* 7, e31318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031318>
- Choi, S.S., Lee, H.J., Lim, I., Satoh, J., Kim, S.U., 2014. Human Astrocytes: Secretome Profiles of Cytokines and Chemokines. *PLoS ONE.* 9, e92325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092325>
- Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* 164, 1079-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
- Dai, H., Ciric, B., Zhang, G.-X., Rostami, A., 2012. Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Bowman-Birk inhibitor. *J. Neuroimmunol.* 245, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.01.005>
- De Paula, M.L., Rodrigues, D.H., Teixeira, H.C., Barsante, M.M., Souza, M.A., Ferreira, A.P., 2008. Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1291-1297. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.05.002>
- Dong, Y., Yong, V.W., 2019. When encephalitogenic T cells collaborate with microglia in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 704-717. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0253-6>

- Glatigny, S., Bettelli, E., 2018. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8, a028977. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028977>
- Gudoityte, E., Arandarcikaite, O., Mazeikiene, I., Bendokas, V., Liobikas, J., 2021. Ursolic and Oleanolic Acids: Plant Metabolites with Neuroprotective Potential. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4599. <https://doi.org/10.3390/ijms22094599>
- Huseby, E.S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlén, C., Goverman, J., 2001. A Pathogenic Role for Myelin-Specific CD8+ T Cells in a Model for Multiple Sclerosis. *J. Exp. Med.* 194, 669-676. <https://doi.org/10.1084/jem.194.5.669>
- Hussain, H., Green, I.R., Ali, I., Khan, I.A., Ali, Z., Al-Sadi, A.M., Ahmed, I., 2017. Ursolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2012-2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 1061-1072. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1344219>
- Jahan-Abad, A.J., Karima, S., Shateri, S., Baram, S.M., Rajaei, S., Morteza-Zadeh, P., Borhani-Haghighi, M., Salari, A., Nikzami, A., Gorji, A., 2019. Serum pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuropathol.* 40, 84-92. <https://doi.org/10.1111/neup.12612>
- Jurga, A.M., Paleczna, M., Kuter, K.Z., 2020. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Kashyap, D., Tuli, H.S., Sharma, A.K., 2016. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* 146, 201-213. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.017>
- Lassmann, H., 2018. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8, a028936. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028936>

Lee, S.Y., Kim, Y.J., Chung, S.O., Park, S.U., 2016. Recent studies on ursolic acid and its biological and pharmacological activity. *EXCLI J.* 15, 221-228.

<https://doi.org/10.17179/excli2016-159>

Pant, A.B., Wang, Y., Mielcarz, D.W., Kasper, E.J., Telesford, K.M., Mishra, M., Haque, A., Channon, J.Y., Kasper, L.H., Begum-Haque, S., 2017. Alteration of CD39+Foxp3+ CD4 T cell and cytokine levels in EAE/MS following anti-CD52 treatment. *J. Neuroimmunol.* 303, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.12.010>

Reich, D.S., Lucchinetti, C.F., Calabresi, P.A., 2018. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 378, 169-180. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483>

Rong, Z.-J., Cai, H.-H., Wang, H., Liu, G.-H., Zhang, Z.-W., Chen, M., Huang, Y.-L., 2022. Ursolic Acid Ameliorates Spinal Cord Injury in Mice by Regulating Gut Microbiota and Metabolic Changes. *Front. Cell. Neurosci.* 16, 872935.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.872935>

Scherrer, E.C., Valadares, Y.M., Alves, C.C.S., Ferreira, G.F., Leão, M.P., Soares, J.A., Silva, F.S., Carli, A.P., Cardoso, O., Machado, F.S., Castro, S.B.R., 2019. Ursolic Acid Derivatives Induced Apoptosis and Reduces the NF- κ B in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *J. Cancer Ther.* 10, 863-876.

<https://doi.org/10.4236/jct.2019.1010073>

Seo, D.Y., Lee, S.R., Heo, J.-W., No, M.-H., Rhee, B.D., Ko, K.S., Kwak, H.-B., Han, J., 2018. Ursolic acid in health and disease. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 22, 235-248.

<https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.3.235>

Tesmer, L.A., Lundy, S.K., Sarkar, S., Fox, D.A., 2008. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* 223, 87-113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2008.00628.x>

- Van Kaer, L., Postoak, J.L., Wang, C., Yang, G., Wu, L., 2019. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell. Mol. Immunol.* 16, 531-539. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0221-5>
- Xu, H., Yu, A.L., Zhao, D.P., Meng, G.Y., Wang, L., Shan, M., Hu, N.X., Liu, Y.L., 2022. Ursolic acid inhibits Th17 cell differentiation via STAT3/ROR γ t pathway and suppresses Schwann cell-mediated Th17 cell migration by reducing CXCL9/10 expression. *Innate Immun.* 28, 155-163. <https://doi.org/10.1177/17534259221094559>
- Xu, T., Wang, X., Zhong, B., Nurieva, R. I., Ding, S., Dong, C., 2011. Ursolic Acid Suppresses Interleukin-17 (IL-17) Production by Selectively Antagonizing the Function of ROR γ t Protein. *J. Biol. Chem.* 286, 22707-22710. <https://doi.org/10.1074/jbc.c111.250407>
- Zhang, Y., Li, X., Ciric, B., Curtis, M. T., Chen, W.-J., Rostami, A., Zhang, G.-X., 2020. A dual effect of ursolic acid to the treatment of multiple sclerosis through both immunomodulation and direct remyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 9082-9093. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000208117>

Figure legends

Figure 1. AUD1 and AUD2 derivatives reduce the clinical signs of EAE.

Clinical score (A) and weight (B) of C57BL/6 mice (n=14 animals per group) immunized or not with MOG₃₅₋₅₅ peptide were recorded from day 0 to day 21 after immunization. Treatments with AU, AUD1 and AUD2 started on day 15 after immunization. CN= non-immunized group, EAE= immunized group, AU= ursolic acid treated immunized group, AUD1= methyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate treated immunized group, AUD2= methyl 3 β -acetoxyurs-12-en-28-oate treated immunized group. Each point represents the mean \pm SEM. *p < 0.05 of EAE versus AU, AUD1 and AUD2. The results were representative of three independent experiments.

Figure 2. AUD1 and AUD2 derivatives reduce inflammation and demyelination in the CNS of EAE.

Histological analysis of longitudinal spinal cord sections of C57BL/6 mice (n=4 animals per group) immunized or not with MOG₃₅₋₅₅ peptide by hematoxylin and eosin staining (A) or luxol fast blue (B). Figures are representative of histological analysis of each experimental group: CN= non-immunized group, EAE= immunized group, AU= ursolic acid treated immunized group, AUD1= methyl 3 β -hydroxyurs-12-in-28-oate treated immunized group, AUD2= methyl 3 β -acetoxyurs-12-in-28-oate treated immunized group. Magnification 40x, bar scale= 100 μ m. Red arrows indicate cell infiltrates and red dotting demyelination. Spinal cord inflammation score (C) and spinal cord demyelination score (D). Each bar represents the mean \pm SEM. *p < 0.05 versus EAE. The results were representative of three independent experiments.

Figure 3. AUD1 and AUD2 derivatives reduce the absolute number of cells in the brain.

The absolute number of CD11c+MHCII+(A), CD11c+CD80+(B), CD11c+CD86+(C), CD4+(D), CD8+(E), CD4+IL-17+(F), CD4+IFN γ +(G) and CD4+IL-10+FOXP3+(H) in mononuclear cells isolated from the brain of C57BL/6 mice on day 21 after induction with MOG₃₅₋₅₅ peptide (n=5 animals per group) were determined by flow cytometry. CN= non-immunized group, EAE= immunized group, AU= ursolic acid treated immunized group, AUD1= methyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate treated immunized group, AUD2= methyl 3 β -acetoxyurs-12-en-28-oate treated immunized group. Each bar represents the mean \pm SEM. * = p < 0.05 versus EAE. The results were representative of three independent experiments.

Figure 4. AUD1 and AUD2 derivatives changes the absolute number of cells in the inguinal lymph nodes.

The absolute number of CD11c+MHCII+(A), CD11c+CD80+(B), CD11c+CD86+(C), CD4+(D), CD8+(E), CD4+IL-17+(F), CD4+IFN γ +(G) and CD4+IL-10+FOXP3+(H) in mononuclear cells isolated from the inguinal lymph nodes of C57BL/6 mice on day 21 after induction with MOG₃₅₋₅₅ peptide (n=5 animals per group) were determined by flow cytometry. CN= non-immunized group, EAE= immunized group, AU= ursolic acid treated immunized group, AUD1= methyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate treated

immunized group, AUD2= methyl 3 β -acetoxyurs-12-en-28-oate treated immunized group. Each bar represents the mean \pm SEM. * = $p < 0.05$ versus EAE. The results were representative of three independent experiments.

Figure 5. AUD1 and AUD2 derivatives reduce IL-1 β and TNF- α cytokines in the spinal cord.

Cytokines IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C), TNF- α (D), IFN- γ (E) and IL-10 (F) in the supernatant of the spinal cord homogenate from C57BL/6 mice on day 21 after induction with MOG₃₅₋₅₅ peptide (n=5 animals per group) were determined by ELISA. CN= non-immunized group, EAE= immunized group, AU= ursolic acid treated immunized group, AUD1= methyl 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oate treated immunized group, AUD2= methyl 3 β -acetoxyurs-12-en-28-oate treated immunized group. Each bar represents the mean \pm SEM. * = $p < 0.05$ versus EAE. The results were representative of three independent experiments.

Figura 1

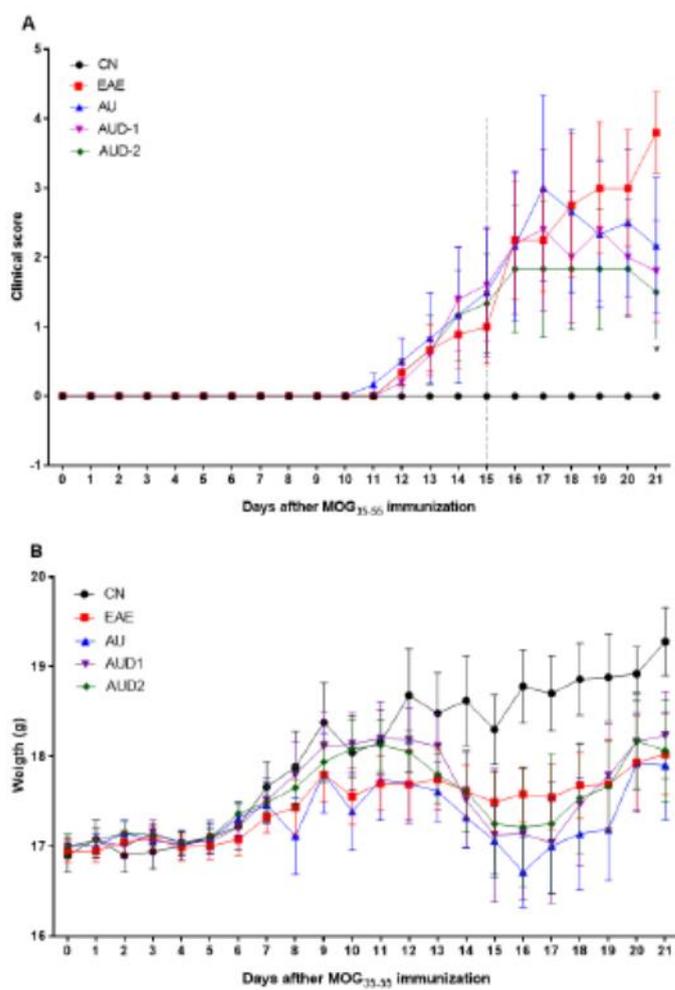


Figura 2

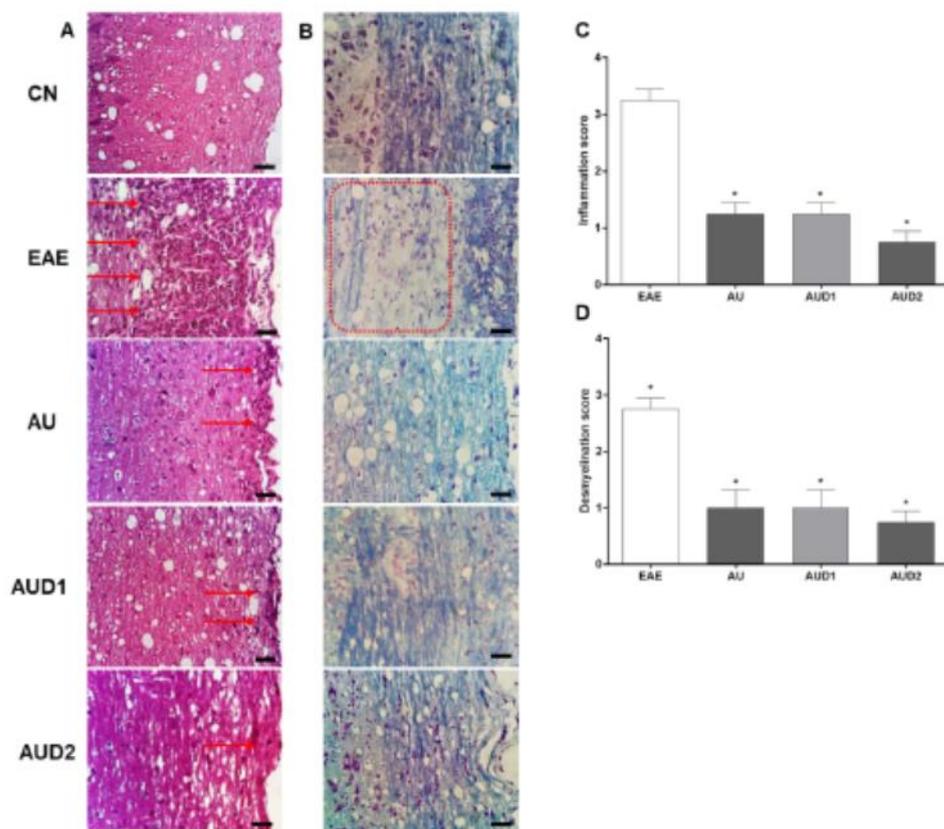


Figura 3

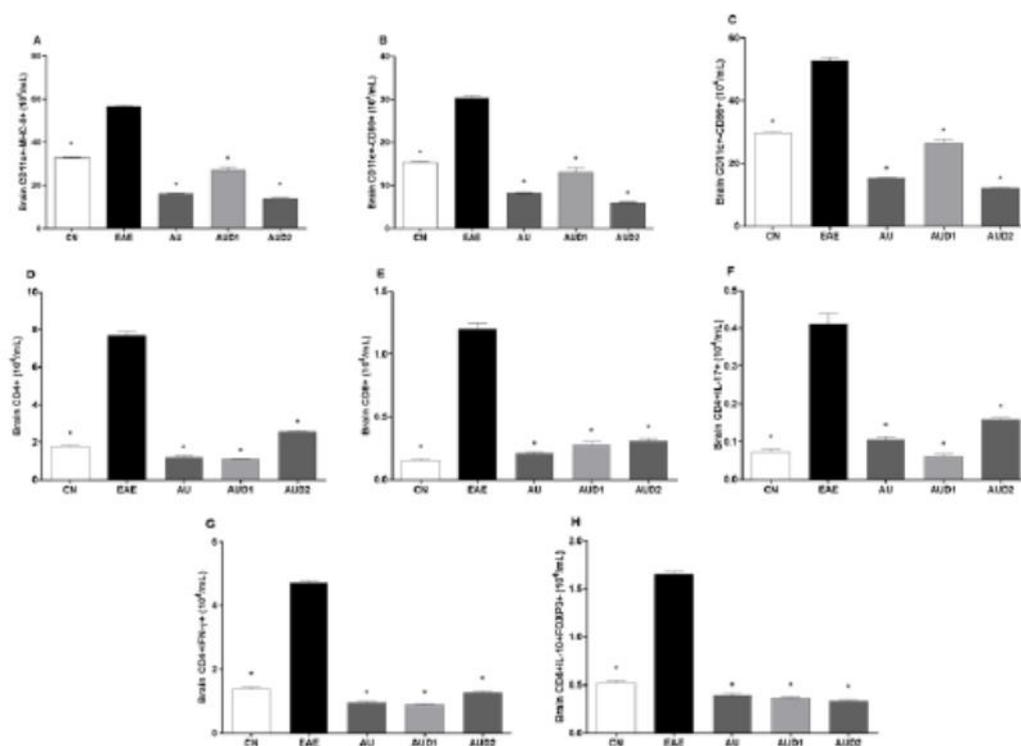


Figura 4

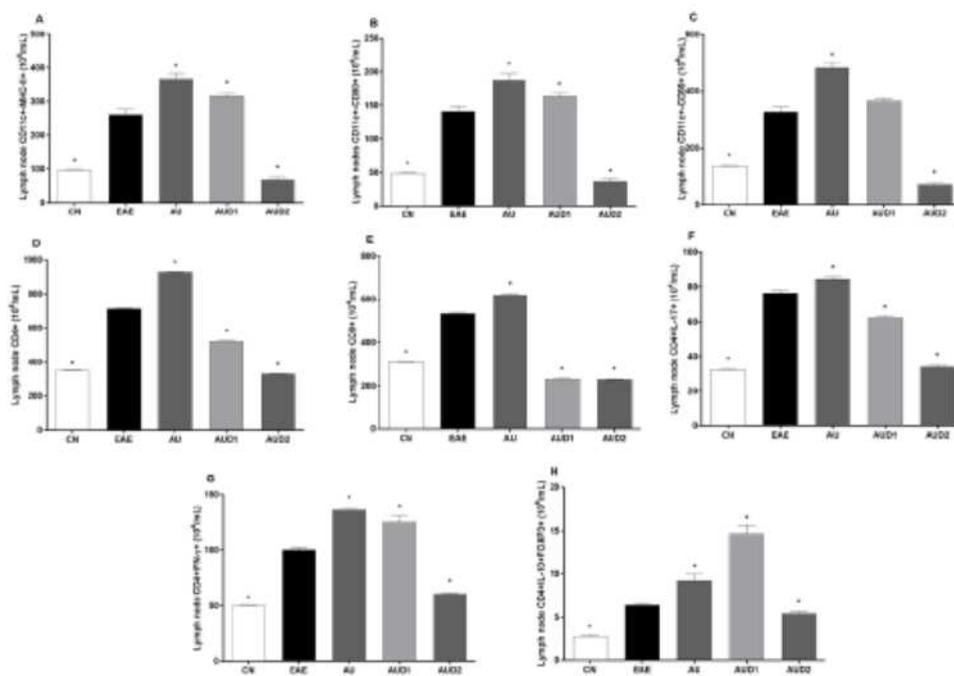
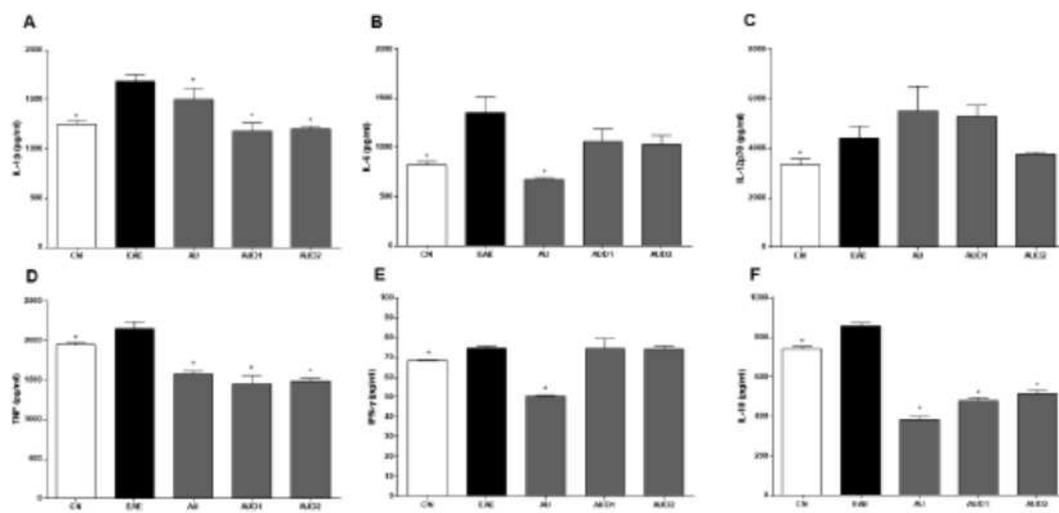
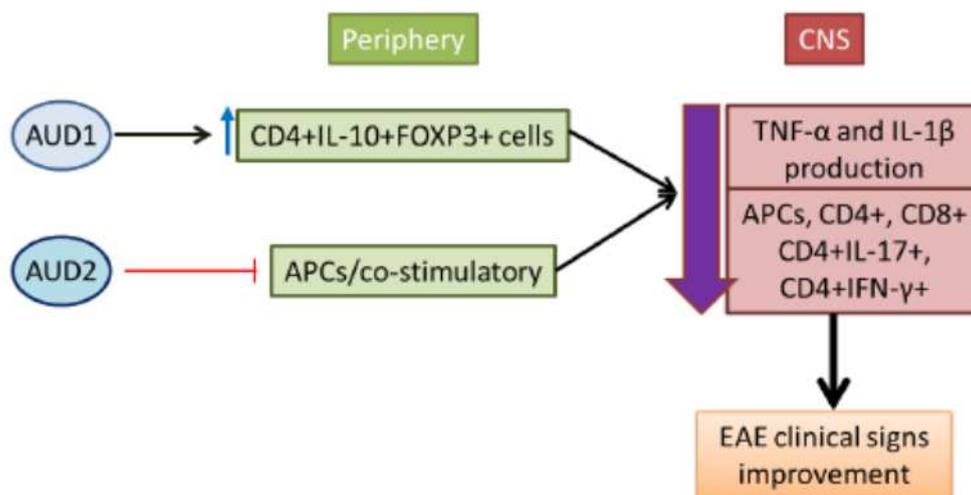


Figure 5



Graphical abstract



Highlights

Ursolic acid derivatives (AUD1 and AUD2) reduced the clinical signs of EAE.

Ursolic acid derivatives (AUD1 and AUD2) reduced CD4+IL-17+ cells.

Ursolic acid derivatives (AUD1 and AUD2) reduced TNF- α and IL-1 β cytokines in the CNS.

Ursolic acid derivatives (AUD1 and AUD2) reduced CD4+IFN- γ + and CD4+IL-17+ cells in the CNS.

Ursolic acid derivative (AUD1) induces CD4+IL-10+FOXP3+ cells in the periphery.