

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LARA SOARES ALEIXO DE CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO E DO PARTENOLIDO  
SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE  
CAMUNDONGOS C57BI/6 APÓS INDUÇÃO DA EAE**

**JUIZ DE FORA – MINAS GERAIS**

**2015**

**LARA SOARES ALEIXO DE CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO E DO PARTENOLIDO  
SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE  
CAMUNDONGOS C57BI/6 APÓS INDUÇÃO DA EAE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Co-orientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

**JUIZ DE FORA – MINAS GERAIS**

**2015**

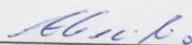
**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO E DO  
PARTENOLIDO SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO  
EM CÉLULAS DE CAMUNDONGOS C57BI/6 APÓS INDUÇÃO DA EAE**

**LARA SOARES ALEIXO DE CARVALHO**

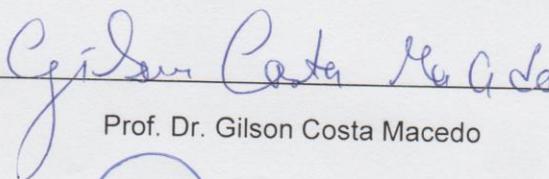
**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

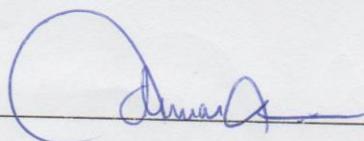
Aprovada em 31/07/2015



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alzira Batista Cecílio



Prof. Dr. Gilson Costa Macedo



Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

*“É na riqueza e força do espírito, onde encontramos as soluções. Assim, o homem deixa de estar encurvado, de estar doente e de estar morto, porque o homem interior não se curva jamais, nem adoece, nem morre.*

*Quando se sente essa força interior é que se descobre o homem verdadeiro, não o homem das perguntas, mas aquele das respostas”*

Jorge Angel Livraga Rizzi

*Aos meus pais Jorge e Maria, ao meu irmão  
Thiago e ao meu querido Victor, pelos conselhos e  
apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ademar, grande mestre e amigo, e principal responsável pelo meu ingresso na pesquisa científica. Obrigada por me mostrar o oriente!!!

Ao Prof. José Otávio, pelos ensinamentos e pela excelente oportunidade de participar e aprender muito com o grupo da Bioatividade Celular e Molecular.

À família NIPPAN pelo convívio e amizade, e principalmente ao Matheus e Monique pela grande ajuda durante todo este trabalho.

À Débora e Lívia por sempre estarem dispostas a me ajudar com os ensaios biológicos. Obrigada pelos ensinamentos na área da imunologia, pela paciência e amizade.

Aos funcionários do Horto da Faculdade de Farmácia, principalmente ao Éder e Jesus, pela coleta do material vegetal.

À CENTRALBIO pelo uso do equipamento de HPLC, em especial à Carol pela ajuda na obtenção e entendimento dos cromatogramas.

Ao Departamento de Química da UFJF pelo uso do aparelho de RMN.

Aos amigos da quarta turma do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFJF pela amizade e troca de experiências.

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelos grandes ensinamentos passados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade desta conquista.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG pelos recursos fornecidos para a execução deste projeto.

Ao CNPq pelos recursos fornecidos para a execução deste projeto.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À Deus por ter colocado essas pessoas tão especiais na minha vida!!!

## RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, crônica, progressiva, inflamatória e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) que afeta 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo mais aceito para o estudo da patogênese da EM, devido à sua similaridade clínica e histopatológica a esta doença. Ambas apresentam processos fisiopatológicos mediados por células Th1 e Th17, com produção de citocinas pró-inflamatórias, como Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 17 (IL-17) e pelo óxido nítrico (NO), produzido principalmente por macrófagos. Atualmente, os medicamentos utilizados para a EM atuam sobre alguns desses mediadores inflamatórios, porém devido ao alto custo e efeitos adversos apresentados torna-se necessária a busca por novas terapias que sejam capazes de modular a produção destes mediadores inflamatórios. Assim, no presente trabalho, investigou-se o efeito imunomodulatório *in vitro* do ácido caurenico e do partenolido sobre a produção de NO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e Interleucina 6 (IL-6) em culturas de esplenócitos de camundongos induzidos com EAE. Para isso, a EAE foi induzida em fêmeas de camundongos C57Bl/6 com MOG<sub>35-55</sub> e após 22 dias da indução elas foram eutanasiadas para obtenção dos esplenócitos. Estas células, reestimuladas com MOG<sub>35-55</sub> e lipopolissacarídeo (LPS), receberam as substâncias testadas em três concentrações diferentes (25, 50 e 100  $\mu$ M para o ácido caurenico, e 1, 5 e 20  $\mu$ M para o partenolido). O ácido caurenico reduziu os níveis de NO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17 nas duas maiores concentrações avaliadas. O partenolido diminuiu a produção de IL-6 nas três concentrações, de NO e IL-17 nas duas maiores concentrações e de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  somente na maior concentração avaliada. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o ácido caurenico e o partenolido podem modular a produção dos mediadores químicos em questão, demonstrando o grande potencial destas substâncias para o desenvolvimento de novas abordagens na EAE, modelo animal da EM.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease, chronic, progressive, inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS) that affects 2.5 million people worldwide. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most accepted model for studying the pathogenesis of MS due to its clinical and histopathologic similarity to this disease. Both have pathophysiological processes mediated by Th1 and Th17 cells, with production of pro-inflammatory cytokines such as interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 17 (IL-17) and mediated nitric oxide (NO), mainly produced by macrophages. Currently used medications for MS act on some of these inflammatory mediators, but due to the high cost and adverse effects displayed becomes necessary to search for new substances which are capable of modulating the production of these inflammatory mediators. Thus, in the present study investigated the *in vitro* effect immunomodulatory of the kaurenoic acid and parthenolide on the production of NO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 and Interleukin 6 (IL-6) in splenocyte cultures of mice induced with EAE. For this, EAE was induced in female C57BI/6 with MOG<sub>35-55</sub> and animals were euthanized on the 22<sup>th</sup> day post induction for obtaining splenocytes. These cells restimulated with MOG<sub>35-55</sub> and lipopolysaccharide (LPS) were given the substances tested at three different concentrations (25, 50 and 100  $\mu$ M for kaurenoic acid and 1, 5 and 20  $\mu$ M for the parthenolide). The kaurenoic acid reduced the levels of NO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-17 at the two highest concentrations tested. Parthenolide was able decrease the production of IL-6 in all tested concentrations, although the NO and IL-17, was only decreased by the two highest concentration and TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  was decreased only the highest concentration analyzed. The results obtained in this study suggest that kaurenoic acid and parthenolide may modulate the production of inflammatory mediators, demonstrate the great potential of these substances as prototypes for the development of new approaches in EAE, an animal model of MS.

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

AcOEt	Acetato de etila
BHE	Barreira hematoencefálica
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CFA	Adjuvante Completo de Freud
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EBV	Epstein-Barr vírus
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EM	Esclerose múltipla
EMPP	Forma progressiva-primária
EMPS	Forma progressiva-secundária
EMPR	Forma progressiva com surtos
EMRR	Forma remitente-recorrente
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
Hex	Hexano

HLA	Antígeno leucocitário Humano
HSV	Herpes simplex vírus
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
Hz	Hertz
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
<i>Inos</i>	Óxido nítrico sintetase induzível
IFN- $\gamma$	Interferon gama
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KO	Nocaute
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
MeOH	Metanol
MOG	Glicoproteína da mielina de oligodendrócito
MPB	Proteína básica da mielina
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais
NMSS	Sociedade Americana de Esclerose Múltipla
NO	Óxido nítrico
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
PLP	Proteolípídeo da mielina
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-T	Salina tamponada com fosfato e Tween 20
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética de <sup>1</sup> H
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética de <sup>13</sup> C
SFB	Soro fetal bovino

SNC	Sistema nervoso central
Ss	Extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de <i>Smallanthus sonchifolius</i>
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TGF- $\beta$	Fator transformador de colônias $\beta$
Th	Linfócito T helper
TMS	Tetrametilsilano
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Tp	Extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de <i>Tanacetum parthenium</i>
TpF	Extrato bruto hidroalcoólico filtrado das partes aéreas de <i>Tanacetum parthenium</i>
Treg	Células T regulatórias
UVB	Radiação ultravioleta tipo B
VCAM	Molécula de adesão vascular
VZV	Varicella zoster
$\delta$	Deslocamento químico

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b>	Modelos de EAE ativa comumente utilizadas e suas aplicações.....	29
<b>Tabela 2.</b>	Teores de ácido caurenico em diferentes espécies de plantas.....	44
<b>Tabela 3.</b>	Frações obtidas por CLV da fração Ss.....	55
<b>Tabela 4.</b>	Sub-frações obtidas por cromatografia flash da fração Ss <sub>(2-4)</sub> .....	56
<b>Tabela 5.</b>	Frações obtidas por CLV da fração TpF.....	59
<b>Tabela 6.</b>	Sub-frações obtidas por CC da fração TpF <sub>(4-5)</sub> .....	60
<b>Tabela 7.</b>	Escore clínico dos C57Bl/6 com EAE.....	63
<b>Tabela 8.</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500MHz) de Ss <sub>(2-4)</sub> -5 e dados do ácido caurenico descritos na literatura.....	71
<b>Tabela 9.</b>	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125MHz) de Ss <sub>(2-4)</sub> -5 e dados do ácido caurenico descritos na literatura.....	71
<b>Tabela 10.</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500MHz) de TpF <sub>(4-5)</sub> -15 e dados do partenolido descritos na literatura.....	76
<b>Tabela 11.</b>	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125MHz) de TpF <sub>(4-5)</sub> -15 e dados do partenolido descritos na literatura.....	76
<b>Tabela 12.</b>	Porcentagem de redução de NO e citocinas pelo ácido caurenico e partenolido em comparação ao grupo positivo (EAE).....	92

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Cursos clínicos da EM.....	24
<b>Figura 2.</b>	Taxas de prevalência da EM na América Latina.....	26
<b>Figura 3.</b>	Diferenciação das células TCD4 <sup>+</sup> nos subtipos Th1, Th2, Th17 e Treg.....	35
<b>Figura 4.</b>	Imunopatologia da EM e da EAE.....	35
<b>Figura 5.</b>	Estruturas químicas da mitoxantrona <b>(a)</b> e fingolimod <b>(b)</b> .....	37
<b>Figura 6.</b>	Estruturas químicas da teriflunomida <b>(a)</b> e dimetilfumarato <b>(b)</b> .....	38
<b>Figura 7.</b>	Exemplos de substâncias naturais com atividade imunomodulatória.....	42
<b>Figura 8.</b>	Estrutura química do ácido caurenico.....	43
<b>Figura 9.</b>	Estrutura química do partenolido.....	48
<b>Figura 10.</b>	CCD das frações obtidas da CLV do extrato Ss.....	55
<b>Figura 11.</b>	CCD das sub-frações obtidas da cromatografia flash da fração Ss <sub>(2-4)</sub> .....	56
<b>Figura 12.</b>	Substância isolada da fração Ss <sub>(2-4)</sub> -5.....	56
<b>Figura 13.</b>	Fluxograma demonstrativo do isolamento do Ss <sub>(2-4)</sub> -5 do extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de <i>S. sonchifolius</i> .....	57
<b>Figura 14.</b>	CCD das frações obtidas da CLV do extrato TpF.....	59
<b>Figura 15.</b>	CCD das sub-frações obtidas da CC da fração TpF <sub>(4-5)</sub> .....	60
<b>Figura 16.</b>	Substância isolada da fração TpF <sub>(4-5)</sub> -15.....	60
<b>Figura 17.</b>	Fluxograma demonstrativo do isolamento do TpF <sub>(4-5)</sub> -15 do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de <i>T. parthenium</i> .....	61
<b>Figura 18.</b>	Estrutura química do ácido caurenico isolado das raízes tuberosas de <i>S. sonchifolius</i> .....	69
<b>Figura 19.</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ss <sub>(2-4)</sub> -5 no deslocamento químico de 0,6 a 3,0 ppm, presença dos sinais de ciclo-alcanos.....	70
<b>Figura 20.</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ss <sub>(2-4)</sub> -5 no deslocamento de 4,40 a 5,20 ppm, sinais de hidrogênios olefínicos (δ 4,76 e 4,82 ppm) <b>(a)</b> , e no deslocamento de 0,90 a 1,40 ppm, sinais dos hidrogênios metílicos (δ 1,26 ppm e 0,97 ppm) <b>(b)</b> .....	70
<b>Figura 21.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500MHz) de Ss <sub>(2-4)</sub> -5 identificada como ácido caurenico.....	72
<b>Figura 22.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125MHz) de Ss <sub>(2-4)</sub> -5 identificada como ácido caurenico.....	73
<b>Figura 23.</b>	Estrutura química do partenolido isolado das partes aéreas de <i>T. parthenium</i> .....	74
<b>Figura 24.</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de TpF <sub>(4-5)</sub> -15 no deslocamento de 5,0 a 6,7 ppm, presença dos sinais dos hidrogênios vinílicos.....	74

<b>Figura 25.</b>	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de $\text{TpF}_{(4-5)}-15$ no deslocamento de 2,7 a 4,0 ppm, presença dos sinais dos hidrogênios oximetínicos ( $\delta$ 2,80 e 3,88 ppm).....	75
<b>Figura 26.</b>	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de $\text{TpF}_{(4-5)}-15$ no deslocamento de 1,3 a 1,8 ppm, presença dos sinais dos hidrogênios metílicos ( $\delta$ 1,74 e 1,33 ppm).....	75
<b>Figura 27.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) de $\text{TpF}_{(4-5)}-15$ identificada como partenolido.....	77
<b>Figura 28.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz) de $\text{TpF}_{(4-5)}-15$ identificada como partenolido.....	78
<b>Figura 29.</b>	Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de <i>S. sonchifolius</i> .....	79
<b>Figura 30.</b>	Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do ácido caurenico utilizando-se $\lambda = 200$ nm.....	80
<b>Figura 31.</b>	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de <i>S. sonchifolius</i> e do ácido caurenico.....	80
<b>Figura 32.</b>	Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto hidroalcoólico filtrado das partes aéreas de <i>T. parthenium</i> .....	81
<b>Figura 33.</b>	Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do partenolido utilizando-se $\lambda = 200$ nm.....	82
<b>Figura 34.</b>	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto hidroalcoólico filtrado das partes aéreas de <i>T. parthenium</i> e do partenolido.....	82
<b>Figura 35.</b>	Viabilidade celular de macrófagos peritoneais em contato com ácido caurenico <b>(a)</b> e partenolido <b>(b)</b> em diferentes concentrações.....	84
<b>Figura 36.</b>	Produção de NO em cultura de células peritoneais de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenico <b>(a)</b> ou partenolido <b>(b)</b> .....	86
<b>Figura 37.</b>	Produção de TNF- $\alpha$ em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenico <b>(a)</b> ou partenolido <b>(b)</b> .....	87
<b>Figura 38.</b>	Produção de IFN- $\gamma$ em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenico <b>(a)</b> ou partenolido <b>(b)</b> .....	89
<b>Figura 39.</b>	Produção de IL-6 em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenico <b>(a)</b> ou partenolido <b>(b)</b> .....	90
<b>Figura 40.</b>	Produção de IL-17 em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenico <b>(a)</b> ou partenolido <b>(b)</b> .....	91

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	22
2.1	Esclerose Múltipla.....	22
2.2	Encefalomielite Autoimune Experimental.....	28
2.3	Imunopatologia da Esclerose Múltipla e da Encefalomielite Autoimune Experimental.....	30
2.4	Tratamento da Esclerose Múltipla.....	36
2.5	Produtos Naturais como Protótipos para o Desenvolvimento de Novos Fármacos Anti-inflamatórios e Imunomoduladores.....	39
2.6	Ácido Caurenóico.....	43
2.7	Partenólido.....	47
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	52
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
4.1	Instrumentação e Materiais Cromatográficos.....	53
4.2	Coleta do Material Vegetal e Preparo da Exsicata.....	54
4.3	Obtenção do Extrato Clorofórmico das Raízes Tuberosas de <i>S. sonchifolius</i> .....	54
4.3.1	Isolamento do ácido caurenóico das raízes tuberosas de <i>S. sonchifolius</i> .....	54
4.3.1.1	Fração $Ss_{(2-4)}$ .....	55
4.4	Obtenção do Extrato Hidroalcoólico das Partes Aéreas de <i>T. parthenium</i> .....	58
4.4.1	Isolamento do partenólido das partes aéreas de <i>T. parthenium</i> .....	58
4.4.1.1	Fração $TpF_{(4-5)}$ .....	59
4.5	Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas .....	62
4.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Fotodiodo (CLAE-DAD).....	62
4.7	Avaliação dos Efeitos do Ácido Caurenóico e do Partenólido sobre a Produção de Mediadores Químicos da EAE.....	62
4.7.1	Animais de experimentação.....	62
4.7.2	Indução da EAE.....	63
4.7.3	Grupos experimentais .....	64
4.7.4	Obtenção de células peritoneais e esplenócitos.....	64
4.7.4.1	Obtenção das células do exudato peritoneal.....	64
4.7.4.2	Obtenção dos esplenócitos.....	65
4.7.5	Produção de óxido nítrico (Nitrito).....	65
4.7.6	Determinação das citocinas por ELISA.....	66
4.8	Viabilidade Celular.....	67

4.9	Análise Estatística.....	67
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
5.1	Isolamento dos Metabólitos.....	68
5.2	Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas.....	69
5.2.1	Substância Ss <sub>(2-4)</sub> -5.....	69
5.2.2	Substância TpF <sub>(4-5)</sub> -15.....	74
5.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Fotodiodo (CLAE-DAD).....	79
5.3.1	<i>Smallanthus sonchifolius</i> e ácido caurenico.....	79
5.3.2	<i>Tanacetum parthenium</i> e partenolido.....	80
5.4	Avaliação da Viabilidade Celular <i>in vitro</i> do Ácido Caurenico e do Partenolido sobre Macrófagos Peritoneais.....	82
5.5.	Indução da EAE.....	84
5.6	Avaliação do Ácido Caurenico e do Partenolido sobre os Níveis de Mediadores em Sobrenadante de Esplenócitos de Camundongos C57Bl/6-EAE Induzidos.....	84
5.6.1	Produção de NO.....	85
5.6.2	Fator de necrose tumoral-alfa.....	86
5.6.3	Interferon-gama.....	87
5.6.4	Interleucina IL-6.....	89
5.6.5	Interleucina IL-17.....	90
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica, inflamatória e progressiva do sistema nervoso central (SNC), de natureza autoimune, caracterizada pela infiltração de células T auto reativas com consequente destruição focal da mielina e perda de oligodendrócitos (BHOPALE et al., 2014). Sua etiologia ainda não está totalmente esclarecida, e apesar de estudos correlacionarem fatores genéticos com a maior predisposição ao desenvolvimento da EM, aspectos ambientais observados, como a variação de incidência da doença latitude-dependente, indicam que a EM é uma doença complexa e multifatorial desenvolvendo-se em indivíduos geneticamente susceptíveis após exposição a fatores ambientais ainda não bem definidos (KAKALACHEVA, LÜNEMANN, 2011; OUADGHIRI et al., 2013).

A EM afeta todas as porções do SNC e, apesar de ser vista como uma doença da substância branca, lesões podem ocorrer também na substância cinzenta, abrangendo assim, todo o parênquima onde se desenvolve. Atualmente, sabe-se que o envolvimento do córtex cerebral pode chegar até 93% e sua importância é claramente evidenciada pela relação entre o grau de perda axonal e a incapacidade neurológica observada nos pacientes com EM (LUDWIN, 2006; WALKER et al., 2011; MURTA, FERRARI, 2013).

Geralmente, tem início entre os 20 e 40 anos, sendo a principal causa de incapacidade não traumática em jovens adultos (TULLMAN, 2013). Os sintomas iniciais frequentemente observados são fraqueza nos membros inferiores, distúrbios sensoriais, neurite óptica, diplopia, ataxia, entre outros. Muitas vezes, os pacientes não procuram atenção médica quando esses sintomas são irrelevantes. Conforme a doença evolui, pode-se observar disfunção urinária, fadiga, fraqueza, dor, vertigem, espasmos. Os déficits cognitivos são comuns, especialmente nos casos avançados e incluem perda de memória, déficit de atenção, dificuldade em solucionar problemas e lentidão no processamento das informações. A depressão é observada em 60% dos pacientes durante o curso da doença e a taxa de suicídio é 7,5 vezes maior que a população normal, principalmente entre homens jovens (HAUSER, OKSENBORG, 2006).

A EM apresenta curso clínico variável para cada indivíduo, podendo ser categorizada clinicamente como surto-remissiva ou remitente-recorrente, progressiva primária, progressiva secundária e progressiva com surtos (ZANDIEH et al., 2013).

Segundo a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM, 2013) e o Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa da Esclerose Múltipla (BCTRIMS, 2013), a forma remitente-recorrente, é a de maior importância clínica, pois acomete cerca de 80 a 85% dos pacientes. Esta se caracteriza por episódios de exacerbação dos sintomas seguidos por períodos de estabilidade clínica e, segundo o Ministério da Saúde, cerca de 50% dos casos evoluem para a esclerose múltipla secundária progressiva após 10 anos do diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A EM afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo, com prevalência que varia entre 1 e 150/150.000 habitantes, dependendo do país e população específica (OJEDA et al., 2013). No Brasil, não existem muitos estudos de prevalência, porém alguns pesquisadores afirmam que o número de casos registrados é, em média, de 15 casos para cada 100.000 habitantes na região sudeste (CALLEGARO et al., 2001).

Em relação à imunopatologia da EM, inicialmente, acreditava-se que as citocinas produzidas pela resposta imunológica contra o SNC tinham um padrão específico do tipo Thelper 1 (Th1), sendo a interleucina-12 (IL-12) e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) as principais citocinas envolvidas na indução do processo inflamatório durante o curso da EM. Entretanto, atualmente sabe-se da importância da resposta específica mediada por linfócitos T com um padrão Th17, já que o rompimento da barreira hematoencefálica (BHE) acontece, entre outros fatores, por ação da IL-17, citocina produzida por este tipo celular. Porém, cabe ressaltar que as citocinas pró-inflamatórias e mediadores, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$ , interleucinas IL-12, IL-17, IL-18, IL-4, IL-10, IL-5, fator transformador de colônias  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e algumas quimiocinas também desempenham algum papel na manutenção e estabelecimento de doenças autoimunes como na EM (CORRÊA et al., 2010; FLETCHER et al., 2010).

A limitação de estudos em humanos, a dificuldade do acesso ao tecido lesado (SNC) e a rara realização de autopsias são as principais causas da utilização de modelos animais para os estudos da EM. Esses modelos se tornaram a chave nos estudos e subsequente desenvolvimento de novos medicamentos para doenças autoimunes humanas (PÖLLINGER, 2012). Dessa forma, muito do conhecimento adquirido nas últimas décadas sobre os mecanismos envolvidos nos processos de desmielinização na EM se deve aos estudos conduzidos no modelo experimental, como a encefalomielite autoimune experimental (EAE) (MIX et al., 2008).

A EAE é o modelo animal mais aceito para o desenvolvimento dos estudos, devido às semelhanças clínica, morfológica e histopatológica com a EM. É baseada em uma reação autoimune órgão-específica mediada por células T induzidas contra as proteínas da mielina (WALKER et al., 2011).

A EAE pode ser induzida em animais geneticamente susceptíveis pela imunização com antígenos da mielina emulsificados em adjuvante apropriado. Um dos antígenos que pode ser utilizado é a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA) e posterior ativação do sistema imunológico com toxina pertussis. Animais imunizados dessa forma apresentarão, em torno do 10º dia após imunização, perda de tônus da cauda, seguido de paralisia das patas traseiras e posteriormente das patas dianteiras. Normalmente, após 2 ou 3 dias do pico da doença, o qual geralmente acontece em torno do 19º dia após imunização, os sintomas são amenizados e se apresentam como na forma de surto remissão (FALLARINO et al., 2006).

Este modelo animal também pode ser induzido pela transferência adotiva de células TCD4<sup>+</sup> mielina-específicas de animais isogênicos com EAE para animais saudáveis, reforçando ainda mais o caráter autoimune deste modelo (FLETCHER et al., 2010; CHASTAIN et al., 2011).

Até o presente momento, não existe cura para a EM e nem mesmo um tratamento que seja amplamente eficaz. As terapias atualmente disponíveis visam, principalmente, reduzir o número de surtos, retardar a progressão da doença e a incapacidade cognitiva observada, utilizando-se para isso fármacos anti-inflamatórios e imunomodulatórios (CORRÊA et al., 2010). A primeira linha de tratamento tinha como base o uso dos glicocorticoides, utilizados em alguns casos até hoje, para acelerar o processo de recuperação pós-surto. Porém, estes apresentam uma série de efeitos adversos no uso crônico como indução ao diabetes, osteoporose e atrofia muscular quando usados em altas doses e por longos períodos (BISAGA et al., 2012).

Entre as terapias imunomodulatórias, o Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e o acetato de glatirâmer são as mais utilizadas. Apesar de serem tratamentos de primeira linha, estes medicamentos não são suficientemente eficazes, principalmente nos pacientes que apresentam a forma mais comum, remitente-recorrente. Nesses casos, estes fármacos são pouco efetivos, pois os pacientes acabam por desenvolver reincidências e/ou piora das deficiências (FLETCHER et al., 2010).

Além da ineficácia já observada em alguns casos, as terapias imunomodulatórias apresentam fortes efeitos adversos e custos elevados, o que reafirma a necessidade do desenvolvimento de pesquisas para a descoberta de novos e efetivos fármacos para EM (CORRÊA et al., 2010).

Neste contexto, os produtos naturais, especialmente as plantas medicinais, constituem importante fonte de metabólitos ativos para o desenvolvimento de novos fármacos, visto que, grande parte dos medicamentos disponíveis na terapêutica de várias doenças foram desenvolvidos a partir de fontes naturais (VALLI et al., 2012; BOECK, 2005). Exemplo disso são a morfina e o ácido acetilsalicílico (sintetizado a partir da salicina), fármacos oriundos de plantas medicinais (BARREIRO, BOLZANO, 2009).

Em relação à EM, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com plantas medicinais e seus metabólitos, avaliando-se suas possíveis ações imunomodulatórias no curso da EAE (CASTRO et al., 2012; FONTES et al., 2014; LIU ET al., 2014). Dentre os vários compostos naturais ativos com potencial farmacológico para o tratamento da EM, destacam-se o ácido caurenóico e o partenólido. Essas substâncias têm demonstrado grande potencial imunomodulatório, inibindo a produção de mediadores presentes em processos inflamatórios e na EM, sendo, portanto, substâncias promissoras em experimentos utilizando-se o modelo de EAE (MAGNI et al., 2012; GELMINI et al., 2013).

O ácido caurenóico é o principal diterpeno encontrado nas raízes tuberosas de *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), conhecida como batata yacon, e em diversas outras plantas, como as do gênero *Copaifera* L. (Fabaceae), das quais se extrai o óleo de copaíba. Esse óleo é amplamente utilizado na medicina popular com diversas finalidades, sendo sua ação anti-inflamatória uma das mais estudadas (MELO et al., 2001; GELMINI et al., 2013; RUFATTO et al., 2013). Estudos têm demonstrado a atividade anti-inflamatória e imunomodulatória desempenhada pelo ácido caurenóico, o qual se mostra capaz de inibir vários mediadores como NO, enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), prostaglandinas E2 (PGE<sub>2</sub>), óxido nítrico sintetase induzível (*i*NOS), IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (DIAZ-VICIEDO et al., 2008; CHOI et al., 2011). Além disso, estudos evidenciam a capacidade da inibição da ativação do fator nuclear *Kappa* B (NF- $\kappa$ B) pelo ácido caurenóico. Esse fator de transcrição desempenha um importante papel na regulação de grande número de

genes envolvidos na resposta inflamatória e na EM, assim como na produção das diversas citocinas (HUESO-FLACÓN et al., 2011).

Assim como o ácido caurenóico, o partenólido possui ação anti-inflamatória e imunomodulatória, apresentando grande potencial imunomodulatório na EAE. O partenólido é uma lactona sesquiterpênica encontrada nas partes aéreas de *Tanacetum parthenium* (Asteraceae), conhecida como artemísia ou tanaceto, e utilizada tradicionalmente para o tratamento da enxaqueca e problemas inflamatórios. Além disso, há vários medicamentos fitoterápicos de tanaceto sendo utilizados para o tratamento da enxaqueca, sendo o partenólido a principal substância ativa deste vegetal (KAPLAN et al., 2002).

Com relação às atividades anti-inflamatória e imunomodulatória do partenólido, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que este é capaz de diminuir a expressão de algumas citocinas, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , via inibição da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (LI et al., 2006; MAGNI et al., 2012; ZHAO et al., 2012). Além desse mecanismo de ação, o partenólido também desempenha suas atividades através da inibição do sinalizador de tradução e ativador de transcrição 3 (STAT3), fator de transcrição envolvido na diferenciação de células Th17 e na produção de IL-17, principal interleucina da resposta Th17 e diretamente relacionada à patogênese da EAE (CARLISI et al., 2011; SKOUMAL et al., 2011).

Desta forma, considerando as atividades anti-inflamatória e imunomodulatórias do ácido caurenóico e do partenólido, e o grande potencial destas substâncias no tratamento de doenças autoimunes, torna-se importante a avaliação do efeito imunomodulatório destes compostos na produção de mediadores inflamatórios na patogênese da EAE em camundongos C57BL/6.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. ESCLEROSE MÚLTIPLA

A esclerose múltipla, também conhecida como esclerose em placas, foi descrita pela primeira vez pelo neurologista francês, Jean Martin Charcot, em 1868 (KUMAR et al., 2011). O nome “esclerose” deriva do termo grego que significa cicatrizado ou endurecido, correspondendo às áreas onde foi destruída a mielina no SNC; enquanto que “múltipla” refere-se à condição do número de vezes que se repetem as lesões (CABANILLAS, 2012).

A EM é uma doença inflamatória crônica do SNC, caracterizada por desmielinização, gliose e danos axonais, resultante de uma resposta autoimune contra antígenos da bainha de mielina (FEINSTEN et al., 2013). Embora, Charcot, em 1868, tenha caracterizado a EM como uma doença predominantemente da substância branca, estudos recentes mostram infiltrados inflamatórios perivasculares na substância cinzenta muito semelhantes aos observados na substância branca, sugerindo que a EM pode ser entendida como uma doença inflamatória tanto da substância branca como da cinzenta (LUCCHINETTI et al., 2011). Essas lesões causam múltiplos sinais e sintomas de disfunção neurológica, resultantes da interrupção do impulso nervoso nos tratos mielinizados do SNC (HAUSER, OKSENBERG, 2006).

Os sinais e sintomas mais comuns incluem fraqueza, distúrbios sensoriais, neurite óptica, diplopias e ataxia. Com a evolução da doença, pode-se observar disfunção esfínteriana, fadiga, fraqueza, dor, vertigem, espasmos, depressão e declínio cognitivo (TULLMAN, 2013). Diante das diferentes formas clínicas pelas quais a EM pode se manifestar, um consenso foi realizado por especialistas da Sociedade Americana de Esclerose Múltipla (NMSS), estabelecendo uma padronização da terminologia utilizada para a descrição destas formas clínicas (LUBLIN, REINGOLD, 1996). Os resultados definiram os seguintes cursos clínicos (Figura 1):

- Forma remitente-recorrente (EMRR) - doença claramente definida por surtos com remissão completa ou parcial dos sintomas e períodos entre os surtos caracterizados pela ausência de progressão da doença. Esta é a forma clínica mais

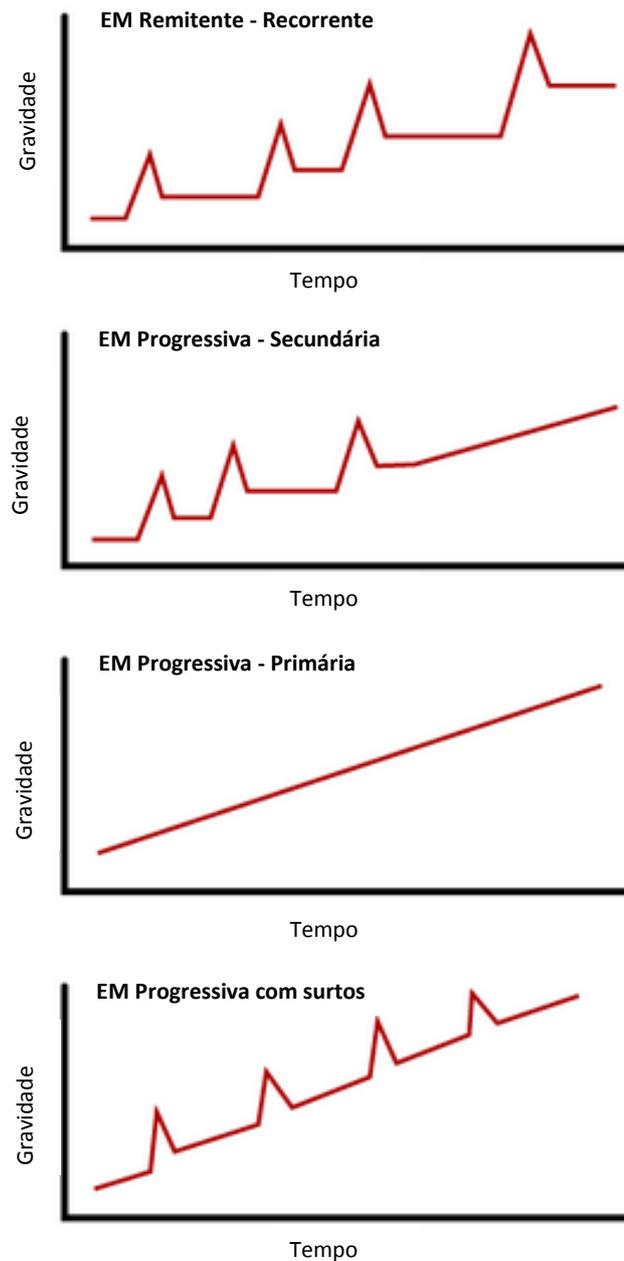
frequente (cerca de 85% dos casos de EM) que, em determinada fase da doença, pode evoluir para a forma progressiva secundária (LUBLIN, 2007).

- Forma progressiva secundária (EMPS) - doença com a forma remitente recorrente no início, seguida pela progressão dos sinais e sintomas com ou sem ocasionais surtos, remissões ou pequenos períodos de estabilidade (LUBLIN, 2007).
- Forma progressiva primária (EMPP) - doença com evolução progressiva desde o início dos sintomas com ocasionais períodos permitidos de estabilidade e melhora. O elemento essencial é a perda gradual das funções com flutuações do quadro clínico, mas sem o aparecimento de surtos (LUBLIN, 2007).
- Forma progressiva com surtos (EMPR) - doença com evolução progressiva desde o início com claros períodos de exacerbação agudos, com ou sem remissão dos sintomas. Os períodos entre os surtos são caracterizados pelo contínuo declínio das funções comprometidas (LUBLIN, 2007).

Os eventos agudos da doença (surtos) e sua progressão insidiosa, supracitados, podem gerar incapacidades funcionais significativas, tanto na esfera sensitivo-motora, quanto na cognitiva. Aliado a sua ocorrência, principalmente, em jovens de 20 a 40 anos, a EM implica em um importante impacto econômico (TULLMAN, 2013).

Atualmente, estima-se que a EM afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo e cerca de 400.000 nos Estados Unidos da América (DENIC et al., 2011). No Brasil, ainda são escassos estudos de prevalência. Em 1990, Callegaro e colaboradores (1992) identificaram na cidade de São Paulo (latitude sul de 23-24<sup>o</sup>) uma taxa de prevalência 4,27/100.000 habitantes (homens: 2,89/100.000; mulheres: 5,59/100.000) com predomínio em adultos jovens. A prevalência encontrada pelo mesmo grupo e na mesma cidade, em 1997, foi de 15/100.000 habitantes (CALLEGARO et al., 2001).

Embora a etiologia da EM não esteja totalmente esclarecida, sabe-se que se trata de uma doença multifatorial de natureza autoimune, onde o fator ambiental, provavelmente de origem infecciosa e a susceptibilidade genética parecem ter um papel essencial na sua determinação (KAKALACHEVA, LÜNEMANN, 2011; OUADGHIRI et al., 2013).



**Figura 1.** Cursos clínicos da EM

Disponível em: [http://wiki.eanswers.com/pt/Esclerose\\_m%C3%BAltipla?ext=t&cid=5083](http://wiki.eanswers.com/pt/Esclerose_m%C3%BAltipla?ext=t&cid=5083),  
 acesso em 04/05/15.

Com relação aos fatores ambientais, estes podem ser relacionados a infecções virais ou bacterianas, fatores comportamentais e estilos de vida. Entre os agentes infecciosos, os vírus são os mais pesquisados e relacionados com a patogênese da EM, incluindo o vírus do sarampo, rubéola, caxumba, EBV (Epstein Barr vírus), HSV (herpes simplex vírus), VZV (varicella zoster) (PENDER, 2012).

Outros fatores ambientais, de origem não infecciosa, também têm sido relacionados ao desenvolvimento da EM. Estudos epidemiológicos demonstraram um aumento na frequência de casos de EM com o aumento da distância da linha do Equador, observando-se uma maior prevalência nos Estados Unidos e alguns países da Europa, que chegam a ter mais de 100 casos a cada 100.000 habitantes (LONGHINI, 2012). No estudo conduzido por Ojeda e colaboradores (2013), observou-se que a prevalência da doença na América Latina também é latitude-dependente, no qual países como Brasil e Argentina (maiores latitudes) apresentam maiores incidências quando comparados a Colômbia e Equador (menores latitudes) (Figura 2).

Alguns pesquisadores relacionam o maior número de casos em países de maiores latitudes com a menor duração e a intensidade da luz do sol, associada aos níveis mais baixos de vitamina D sérica. Estudos têm demonstrado que altos níveis séricos de vitamina D estão associados com uma menor incidência de EM, pois a vitamina D é um imunomodulador potente que afeta vias pró-inflamatórias, e ainda o número e atividade de células T regulatórias ( $T_{reg}$ ) (KAKALACHEVA, LÜNEMANN, 2011).



**Figura 2.** Taxas de prevalência da EM na América Latina

Fonte: Ojeda et al., 2013.

Além dos fatores ambientais, há evidências da contribuição genética para a susceptibilidade de desenvolvimento da EM. Estudos familiares indicam que a taxa de risco de recorrência da doença está aumentada em parentes de primeiro grau, diminuindo com a distância genética (KENEALY et al., 2003). Pesquisas realizadas com gêmeos são importantes ferramentas utilizadas para sugerir se uma doença é devido a fatores genéticos ou ambientais. Nesse sentido, estudo realizado por Bogdanos e colaboradores (2012), com a participação de gêmeos, foram encontrados entre os indivíduos portadores de EM, 25,3% sendo gêmeos monozigóticos, 5,4% eram dizigóticos e entre irmãos não-gêmeos de 2,9%.

Assim como em outras doenças autoimunes, a EM acomete mais mulheres do que homens, com uma taxa de prevalência de 3:1 (HARBO et al., 2013). Diante dessa expressiva diferença, estudos têm sido realizados a fim de se investigar o

papel do sistema imune e sistema nervoso nos diferentes sexos. No estudo realizado por Voskuhl e colaboradores (1996), utilizando o modelo experimental EAE, observou-se que a transferência adotiva de células T isoladas dos linfonodos de camundongos fêmeas promoviam o desenvolvimento de mais casos de EAE e de forma mais intensa do que quando essas células vinham de camundongos machos. Por outro lado, Harbo e colaboradores (2013) relataram o papel neuroprotetor dos hormônios gonadais na EM, observando-se uma melhora na sintomatologia da doença com o aumento dos níveis de hormônios sexuais durante a gravidez, principalmente progesterona, estradiol e estriol.

Estudos genéticos também têm sido realizados em alelos que apresentam relevância biológica para a doença. Dentre eles, os genes do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) de classe II são os mais estudados, visto que seus produtos estão envolvidos na apresentação de antígenos aos linfócitos T. O alelo HLA-DRB1\*1501 está fortemente associado (20-50%) com a EM na população caucasóide (OUADGHIRI et al., 2013). Além dos genes do HLA, outros genes têm sido associados tanto com a prevalência quanto com a evolução da EM, incluindo os que codificam os membros da família dos receptores do TGF- $\beta$ , o antígeno de células T citotóxicas 4 (CTLA-4), o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a IL1 e os receptores de estrogênio (MIX et al., 2010).

Contudo, apesar da contribuição destes fatores, a hipótese atualmente mais aceita considera a EM como uma doença autoimune, na qual ocorre um processo inflamatório mediado por células TCD4<sup>+</sup> autorreativas que reconhecem como antígenos os constituintes da bainha de mielina, levando a desmielinização e a posterior neurodegeneração (SELMI et al., 2011). As células T autorreativas migram através da BHE causando danos aos neurônios centrais e suas bainhas de mielina, processo de desmielinização, o qual leva a um bloqueio da condução do sinal nervoso ou a torna mais lenta. Os sintomas neurológicos se desenvolvem quando o bloqueio da condução acomete uma proporção considerável de fibras nervosas de uma determinada via (FLETCHER et al., 2010).

## 2.2. ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

Muito do conhecimento adquirido sobre a participação da resposta imunológica na EM se deve ao estudo desenvolvido no modelo experimental, a encefalomielite autoimune experimental (CORRÊA et al., 2010).

A EAE é uma doença inflamatória do SNC, induzida em animais geneticamente susceptíveis através da imunização ativa com peptídeos da mielina, dentre eles a proteína básica da mielina (MPB), proteolipídio da mielina (PLP), glicoproteína de oligodendrócito associada à mielina (MOG) ou glicoproteína associada à mielina (MAG), ou ainda através da transferência adotiva de células TCD4<sup>+</sup> reativas a mielina. É amplamente utilizada como modelo animal de esclerose múltipla e como modelo de doença autoimune órgão específica, a qual se assemelha à EM nas suas características clínicas, histopatológicas e imunológicas (PEZAVENTO et al., 2013).

Dependendo da linhagem animal e da estratégia de indução utilizada, existem diversas variações do modelo de EAE (CROXFORD et al., 2010; MIX et al., 2010) (Tabela 1).

Atualmente, o modelo mais utilizado e que servirá de estudo neste trabalho, é o de imunização de camundongos geneticamente susceptíveis a doença, da linhagem C57Bl/6 pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Esse modelo apresenta um padrão muito semelhante ao encontrado na EM, caracterizado pelo rompimento da BHE, invasão de células T autorreativas e macrófagos, e lesões inflamatórias e desmielinizantes no nervo óptico, quiasmas e substância branca do cérebro e medula espinhal (CROXFORD et al., 2010; MIX et al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013). Além disso, esse modelo de EAE apresenta um padrão altamente reprodutível e previsível, no qual os animais apresentam paralisia de caráter ascendente e, quando expostos a antígenos da mielina, expressam maior número de receptores de células T para MOG e um maior título de anticorpos anti-MOG, resultando em uma forma mais grave da EAE (CROXFORD et al., 2010; MIX et al., 2010).

Tabela 1. Modelos de EAE ativa comumente utilizadas e suas aplicações.

<b>Espécie/ Linhagem</b>	<b>Peptídeos da EAE</b>	<b>indutores</b>	<b>Estudos e aplicações</b>
C57BL/6	MOG <sub>35-55</sub> ;		Patogênese mediada por células CD4 <sup>+</sup> Th1/Th17; validação pré-clínica de compostos terapêuticos; sistema nervoso periférico poupado.
SJL/J	MOG <sub>92-106</sub> ; PLP <sub>178-191</sub> ; MPB; MPB <sub>89-101</sub> ;	PLP <sub>139-151</sub> ; PLP <sub>104-117</sub> ;	Estudo dos mecanismos do surto; controle genético de doença autoimune; desmielinização mediada por anticorpo; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
Ratos Lewis	MPB; MPB <sub>29-84</sub> ; MPB <sub>61-82</sub> ; MPB <sub>80-105</sub> ; MPB <sub>170-186</sub>		Estudo de comportamento migratório de células T autoimunes; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
Ratos DA, BN	MOG		Desmielinização mediada por anticorpos; mimetismo molecular; controle genético da autoimunidade.
Macaco Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )	MPB; MOG <sub>34-56</sub>		Patologia axonal; infiltrados perivasculares e desmielinização no cérebro e medula espinhal; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
Sagüi comum ( <i>Callit-hrix jacchus</i> )	MOG; MOG <sub>14-36</sub>		Similar ao macaco <i>Rhesus</i> .

Fonte: FONTES, 2013.

### **2.3. IMUNOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA E DA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Os estudos conduzidos no modelo experimental da EM, a encefalomielite autoimune experimental, foram fundamentais para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo de desmielinização da doença (FLETCHER et al., 2010).

A EAE é mediada por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e manifesta-se clinicamente por deficiência neurológica, histologicamente por infiltrado perivascular de células mononucleares no encéfalo, e imunologicamente pela presença de resposta celular e humoral aos componentes da mielina (HALLAL et al., 2003).

O SNC de indivíduos normais é considerado imunologicamente privilegiado pela existência da BHE, que restringe a entrada de células e moléculas complexas para o tecido cerebral. Após amadurecimento no timo, o linfócito T naive, se lança na corrente sanguínea e circula por todo o corpo. O processo de entrada e transmigração para o SNC de linfócitos T se dá pela ativação de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1) (HARTUNG et al., 1995).

A expressão dessas moléculas aumenta sob a ação de citocinas geradas durante o curso da resposta inflamatória, podendo ser medida nos fluidos corpóreos (SPRINGER, 1994; GEARING, NEWMAN, 1993). O aumento dos níveis das moléculas de adesão no líquido cefalorraquidiano, dos pacientes com EM, está correlacionado ao dano da BHE e lesões desmielinizantes, evidenciando o processo inflamatório e os mecanismos de desmielinização autoimune (HARTUNG et al., 1995).

Com a passagem das células T pela BHE, o microambiente do SNC torna-se um fator importante na interação das células infiltradas com as células residentes. As células T encefalitogênicas iniciam o processo inflamatório, e produzem citocinas que atraem e ativam macrófagos, considerados necessários à patogênese da doença. A ativação dos macrófagos e células T leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17, IL-23, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (BHOPALE et al., 2014).

As células TCD4<sup>+</sup> podem ser divididas classicamente em 4 subpopulações que desencadeiam diferentes tipos de respostas imunes adaptativas: Th1, Th2, Th17 e Treg. As células Th1 secretam especificamente a IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e as

Th2 são responsáveis pela liberação de citocinas como IL-4, IL-5 e a IL-10. A diferenciação das células TCD4<sup>+</sup> no subtipo Th1 acontece por ação da IL-12 que ativa os fatores de transcrição T-bet e STAT4. Já o processo de diferenciação em Th2 é induzido pelos fatores de transcrição GATA3 e STAT5. As células Th17 secretam principalmente a IL-17, além da IL-21 e IL-22. Para a diferenciação em Th17, o linfócito naíve (virgem) deve ser estimulado pela IL-6 e TGF- $\beta$ , sendo que a IL-1 também é capaz de estimular essa diferenciação. Essas citocinas ativam os fatores de transcrição ROR $\gamma$ t e STAT3. E por fim, a diferenciação em Treg ocorre pelo estímulo de citocinas TGF- $\beta$ , IL-1 e IL-10 em presença de ácido retinoico, esses ativam os fatores de transcrição FoxP3 e STAT5 e secretam TGF- $\beta$  (Figura 3) (FLETCHER et al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013).

Inicialmente, acreditava-se que a EAE era conduzida classicamente por citocinas de células Th1, como IL-12 e IFN- $\gamma$ . O efeito danoso do IFN- $\gamma$ , produzido por células Th1, no processo de desmielinização foi confirmado com descrição da IL-12, uma interleucina indutora de IFN- $\gamma$  que também está aumentada na EM (BETTELLI et al., 2006; VELDHOEN et al., 2006; FLETCHER et al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013). Entretanto, diversos achados não podiam ser explicados somente por respostas imunes Th1-mediadas, assim como na EM. Alguns estudos mostraram que animais geneticamente deficientes para o IFN- $\gamma$  desenvolviam EAE normalmente (FERBER et al., 1996). Já outros estudos demonstraram que camundongos sem IL-17, ou que sofreram neutralização por anticorpos anti-IL17, sofreram redução na severidade e retardo no início da EAE, indicando a importância das células Th17 na patogênese da doença, assim como na EM (WANG et al., 2013).

A importância da Th17 na EAE foi demonstrada em animais knockout (KO) para IL-17, os quais apresentaram resistência parcial à doença. Assim, a proteção apresentada em animais KO para a IL-17 mostra que a EAE não é resultado de uma resposta Th17 isolada, mas sim de uma resposta Th1 e Th17 associadas. Na EM, o papel da Th17 também tem sido relatado, através de análise de microarranjos onde foi encontrado um aumento da transcrição da IL-17 em lesões de EM. Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com EM possuem níveis aumentados de IL-17 quando comparados com amostras de pacientes sadios (ZHOU et al., 2007; WEI et al., 2007; WANG et al., 2011).

A diferenciação dos linfócitos Th17 é regulada por uma complexa rede de citocinas. Enquanto o TGF- $\beta$  promove a diferenciação de linfócitos T reguladores que apresentam a capacidade de inibir a resposta inflamatória, a presença de IL-6 produzida pela resposta imune inata no microambiente onde a resposta imune acontece somada ao efeito de TGF- $\beta$ , promove a diferenciação das células Th17 (BETTELLI et al., 2008). As citocinas IL-6 e TGF- $\beta$  induzem as células T naive a secretarem IL-21 que por sua vez, funciona de forma autócrina e aumenta o fator de transcrição da linhagem Th17 o ROR $\gamma$ t aumentando a expressão de IL-17 (YANG et al., 2008). A IL-23 atua na expansão e manutenção da população dos linfócitos Th17 contribuindo para o aumento da gravidade da EAE (OUYANG et al., 2008). Além da IL-6 e TGF- $\beta$ , outras citocinas incluindo a IL-1, IL-13, IL-18, IL-22, IL-23 e TNF- $\alpha$  participam da diferenciação e expansão da Th17 (Figura 3) (BETTELLI et al., 2008).

Na fase de recuperação da EAE, citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  foram identificadas, tanto no SNC como na periferia. Vários trabalhos têm demonstrado a importante ação da IL-10 no controle da EAE, através do seu efeito imunorregulador (MOORE et al., 2001). No trabalho de Jander e colaboradores (1998) observou-se que a expressão de IL-10 está aumentada no SNC de animais na fase de recuperação da EAE. Complementando esse estudo, Cua e colaboradores (2001) demonstraram que a administração exógena de IL-10 induz, significativamente, a redução da gravidade da doença. Estudos recentes ainda mostram que a IL-10 inibe a produção de uma grande variedade de citocinas produzidas pelas células T, afetando a apresentação de antígeno e coestimulação mediada por células apresentadoras de antígenos, que são fundamentais para o desencadeamento da resposta imune (MOORE et al., 2001; DAI et al., 2012).

Diante desses dados, pode-se afirmar que o TGF- $\beta$  desempenha uma função ambígua durante a inflamação, podendo tanto promover a indução células-T, com função reguladora e imunossupressora (Treg), como o desenvolvimento de células pró-inflamatórias Th17 (THÖNE et al., 2012). Como descrito anteriormente, o TGF- $\beta$ , sob condições inflamatórias, induz juntamente com a IL-6 uma diferenciação em células Th17. Já sua ação imunossupressora ocorre através da indução da expressão Foxp3, levando a diferenciação de Treg (THÖNE et al., 2012). Pesquisadores têm demonstrado o aumento da produção de TGF- $\beta$  no SNC na fase de recuperação da EAE (KHOURY et al., 1992). Além disso, no estudo conduzido

por Bettelli e colaboradores (2008) foi descrito a atuação do TGF- $\beta$  na ativação de células T reguladoras com consequente redução da gravidade da EAE.

Resumidamente, a imunopatologia da EM e EAE ocorre pela ativação na periferia das células T que podem migrar através da BHE e liberar citocinas dentro do SNC. O mecanismo de migração das células para o SNC é complexo e dependente do contato íntimo das células autoreativas e moléculas expressas no endotélio vascular, ICAM-1 e VCAM-1. Os linfócitos T ativados, após atravessarem o endotélio vascular, precisam vencer uma barreira de matriz extracelular composta por colágeno tipo IV. As metaloproteinases, gelatinases A e B, são fundamentais para facilitar a chegada dos linfócitos na substância branca do SNC e são detectáveis no LCR de pacientes com EM. A manutenção do processo é garantida pela ação de quimiotáticos como C5a (fragmento de proteína liberada a partir de componente do complemento) e fator ativador de plaqueta (OSBORN et al., 1989; WEINER, 2009).

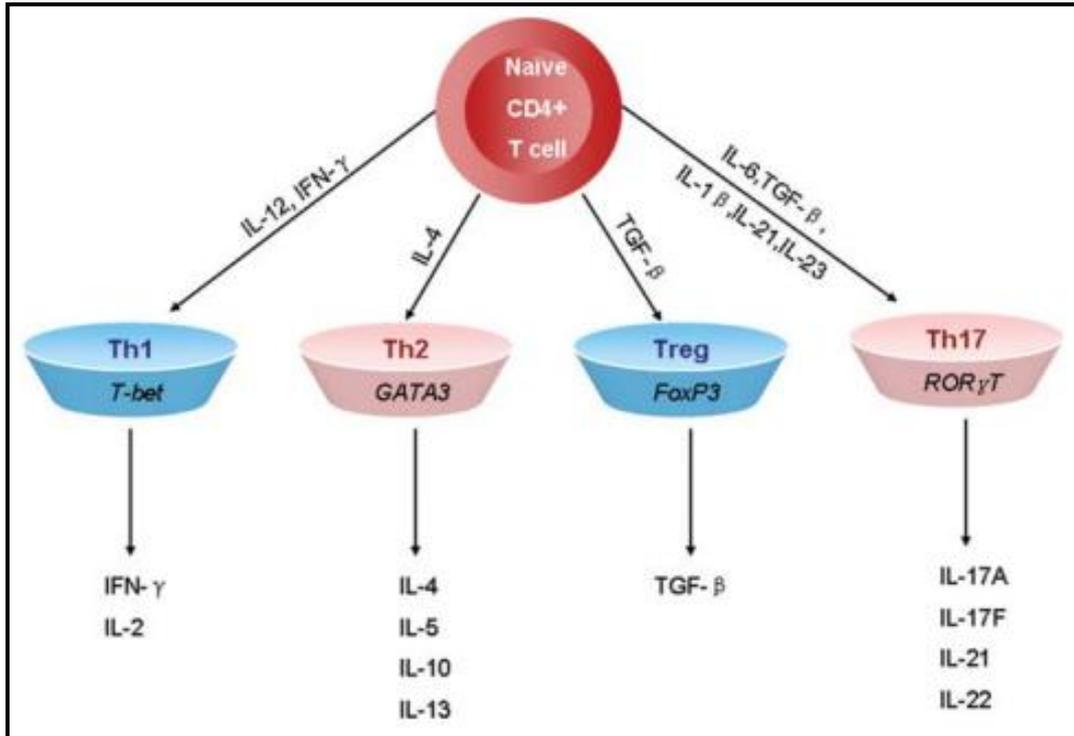
Após atravessarem a BHE, as células T autorreativas são reativadas por fragmentos dos antígenos da mielina. Esta reativação promove liberação adicional de citocinas pró-inflamatórias, as quais promovem o recrutamento de células fagocitárias (macrófagos da periferia e micróglia do SNC) que vão desencadear o ataque da mielina (ocorrendo a amplificação local da inflamação). Nesse ambiente ocorre a indução de diferentes mecanismos efetores. Tais mecanismos incluem: citotoxicidade mediada por anticorpos; radicais de nitrogênio (NO) e oxigênio ( $H_2O_2$ ); citocinas tóxicas como o TNF- $\alpha$  e moléculas mediadoras de apoptose. O resultado é a agressão ao oligodendrócito, à bainha de mielina e ao axônio (Figura 4) (STEINMAN, 1996; STEINMAN et al., 2005).

As enzimas proteolíticas, radicais de oxigênio e óxido nítrico, liberados principalmente por macrófagos e micróglia ativados, atuam na indução das reações inflamatórias da EM, sendo os principais responsáveis pelo dano tecidual do SNC (FARIAS et al., 2007). Estudos mostram que o aumento dos níveis de radicais livres como NO e  $H_2O_2$  foram associados aos sintomas neurológicos como resultado da lesão direta dos oligodendrócitos e axônios (FIGUEROA-VEJA et al., 2008; LINKER et al., 2011).

As enzimas NO sintetases (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese do NO, enzima presente em três isoformas, sendo a forma indutível (*iNOS*) a envolvida nas reações inflamatórias. Tal enzima está induzida em

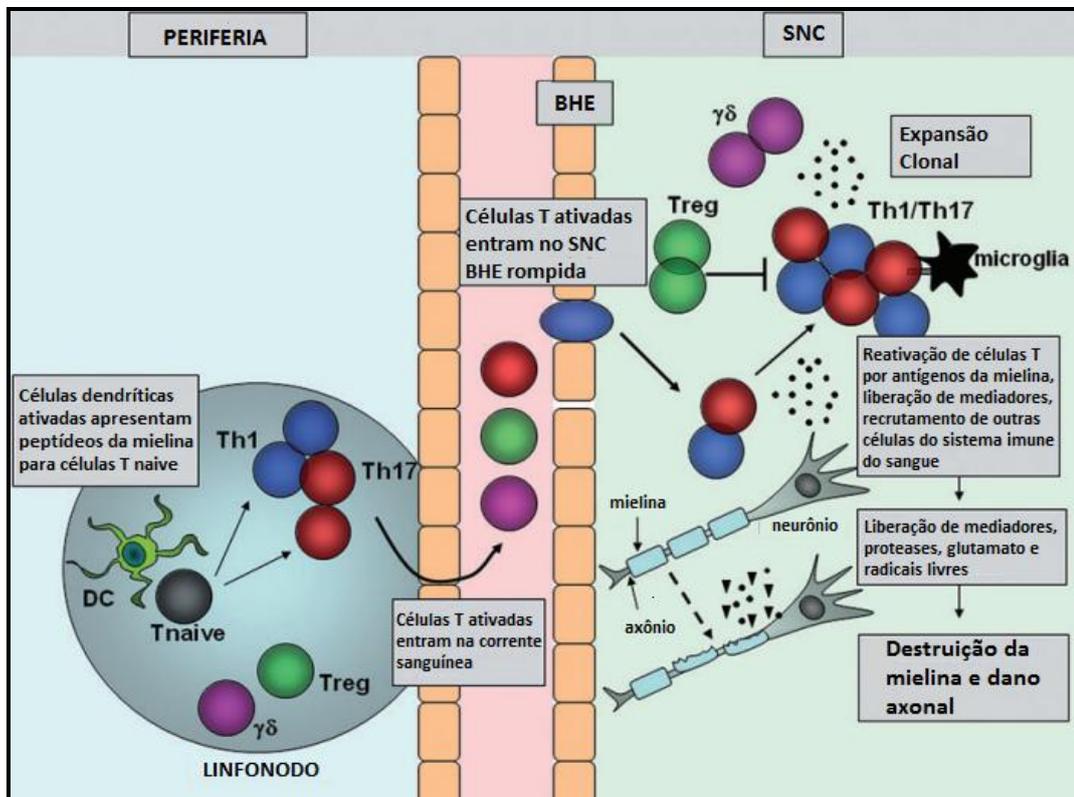
macrófagos e outras células (LEE et al., 2012; MARTÍNEZ et al., 1999). Farias e colaboradores (2007) mostraram a participação ativa do NO, através das *iNOS*, no modelo de EAE induzida em camundongos. Neste modelo, os animais geneticamente deficientes para a enzima NO sintetase induzida apresentaram uma doença menos grave, quando comparados aos animais não modificados geneticamente (FARIAS et al., 2007).

A partir do conhecimento da imunopatologia da EM, os tratamentos objetivam diminuir a atividade do sistema imunológico, retomando as funções normais do indivíduo após um ataque, impedindo novos surtos, prevenindo assim, a ocorrência de deficiência, já que a cura não existe (FLETCHER et al., 2010).



**Figura 3.** Diferenciação das células TCD4<sup>+</sup> nos subtipos Th1, Th2, Th17 e Treg.

Fonte: WANG et al., 2013.



**Figura 4.** Imunopatologia da EM e da EAE.

Adaptado: FLETCHER et al., 2010.

## 2.4. TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

As terapias disponíveis atualmente para o tratamento da EM são voltadas para a diminuição do risco de ocorrência de novos surtos e da progressão da incapacidade neurológica (FLETCHER et al., 2010). Os primeiros tratamentos tinham como base o uso de corticosteroides, principalmente durante os surtos, os quais diminuía o infiltrado celular inflamatório no SNC. No entanto, estes medicamentos apresentam uma série de efeitos secundários indesejáveis como, osteoporose, Síndrome de Cushing, erupção cutânea pústula, aumento da pressão arterial, e em casos raros, risco de sangramento gástrico (CORRÊA et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012).

Dessa forma, nos últimos anos, várias medicações foram lançadas com sucesso no mercado, chamadas de terapias modificadoras da doença, mas com um controle parcial da EM (SILVA, 2010). Até o momento existem as terapias de primeira e de segunda linha, e os medicamentos utilizados têm mostrado eficácia significativa, porém, além do alto custo, estes produzem diversos efeitos adversos, e ainda requerem administração parenteral frequente, limitando a adesão dos pacientes ao tratamento (GASPERINI et al., 2013).

Os agentes imunomodulatórios que constituem a terapia de primeira linha são Interferon- $\beta$  e Acetato de glatirâmer. Em relação ao primeiro, sabe-se que além de possuir propriedades antivirais, este fármaco apresenta uma complexa atividade imunomoduladora, atuando diminuindo as citocinas inflamatórias como IL-12 e aumentando as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Já o Acetato de glatirâmer é estruturalmente semelhante à Proteína Básica da Mielina, porém não causa encefalite. Os mecanismos propostos para a atividade biológica deste medicamento são a indução de células T supressoras antígeno-específico e a inibição competitiva com os antígenos da Proteína Básica da Mielina (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012).

Estes medicamentos possuem efeitos adversos mais suaves, porém podem ser apenas parcialmente efetivos. Cerca de um terço dos pacientes com EMRR em tratamento com estes medicamentos podem desenvolver reincidências e produzirem anticorpos neutralizantes ao IFN- $\beta$  (FLETCHER et al., 2010).

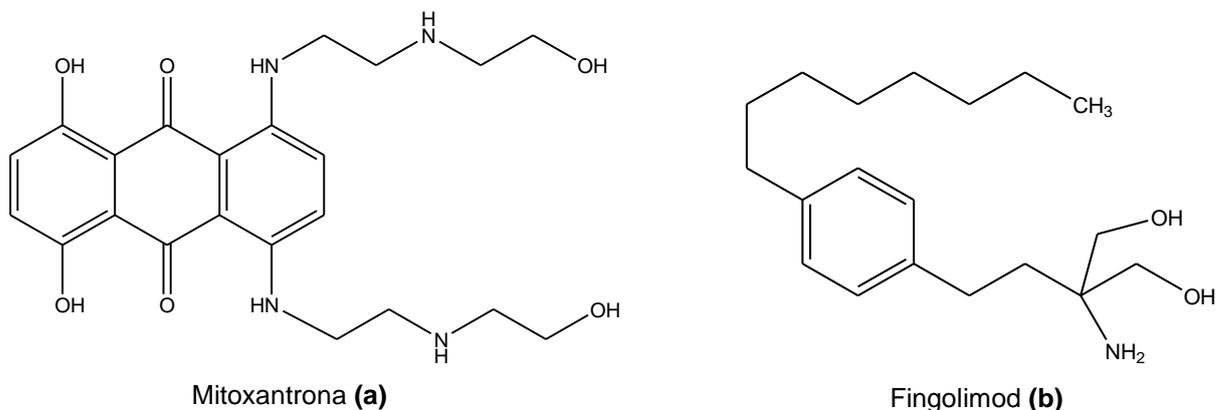
Dessa forma, aqueles pacientes, em terapia com esses fármacos, que apresentarem resultados abaixo do esperado e pacientes portadores da forma

secundária progressiva, que geralmente não respondem a essa terapia, terão um novo esquema terapêutico. Essa terapia é baseada em fármacos de segunda linha, os quais incluem o Natalizumab, Mitoxantrona e Fingolimod (FLETCHER et al., 2010).

Em relação ao Natalizumab, um anticorpo monoclonal contra  $\alpha$ -4 integrina, sabe-se que é um antagonista monoclonal de uma glicoproteína expressa em linfócitos e monócitos, essenciais para o processo de migração através da BHE. Desta maneira, o principal mecanismo de ação do natalizumab é o bloqueio da migração de células inflamatórias, principalmente linfócitos, para dentro do SNC (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012).

A Mitoxantrona (Figura 5a), derivado antraquinona, é um imunossupressor também utilizado em quimioterapia de câncer. Embora seu mecanismo de ação não tenha sido determinado, mitoxantrona é um agente DNA reativo, ligando-se ao DNA e produzindo quebra das fitas, inibindo a síntese tanto do DNA quanto do RNA (MORRIS, YIANNIKAS, 2012).

Já o Fingolimod (Figura 5b), obtido através da modificação molecular de um composto isolado a partir de cultura caldos de *Isaria sinclairii*, um fungo que ataca os insetos, atua bloqueando a ação do receptor em células T denominado receptor esfingosina-1-fosfato. Tal receptor está envolvido na regulação do movimento destas células no organismo, impedindo a migração para o SNC (CHIBA, ADACHI, 2012).

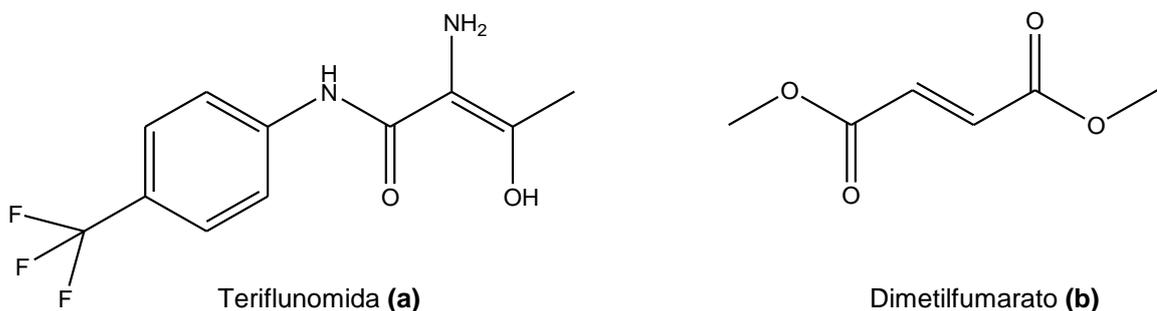


**Figura 5.** Estruturas químicas da mitoxantrona (a) e fingolimod (b).

Apesar de todos os tratamentos descritos serem considerados promissores na eficácia, estes fármacos estão relacionados com um número elevado de efeitos adversos, que vão desde cefaleia, tontura, vômitos, até os mais graves como cardiotoxicidade e infecções respiratórias e das vias urinárias (WEBER et al., 2012).

Neste contexto, muitas pesquisas vêm sendo realizadas ao longo dos anos buscando novas alternativas terapêuticas para o tratamento da EM. Enquanto conceitos anteriores focavam sobre os linfócitos T como a chave para mediar os danos inflamatórios das lesões do SNC, atualmente sugere-se que os linfócitos B podem desempenhar um papel importante na patogênese desta doença. Assim, terapias com anticorpos anti-CD20, um marcador de células B presente durante toda a maturação destas células, como o Rituximab e o seu sucessor Ocrelizumab, tem sido testadas em ensaios clínicos. Estes foram capazes de promover um declínio no desenvolvimento de lesões inflamatórias no SNC de pacientes com EMRR, porém essa depleção de células B pode levar a diversos efeitos adversos, pois além da imunossupressão, essa depleção não é seletiva, atuando também, portanto, em subtipos de células B com efeito protetor e regulatório (LEHMANN-HORN et al., 2013).

Recentemente, dois novos medicamentos foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para a EM, principalmente para pacientes com a forma remitente-recorrente da doença, são eles, a teriflunomida (Figura 6a), aprovada em setembro de 2012, e o dimetilfumarato (Figura 6b), aprovado em março de 2013 (FDA, 2012, 2013).



**Figura 6.** Estruturas químicas da teriflunomida (a) e dimetilfumarato (b).

A Teriflunomida é um imunomodulador que reduz a ativação, proliferação e função dos linfócitos T e B, porém, possui como efeitos adversos hepatotoxicidade e riscos de malformação congênita (FDA, 2012). Já o dimetilfumarato age conferindo

proteção ao SNC devido às propriedades antioxidantes via Nrf2, um fator de transcrição importante na proteção contra o estresse oxidativo (LINKER et al., 2011).

Embora ainda distantes de uma abordagem curativa, os avanços recentes permitem oferecer tratamento relativamente efetivo para os portadores da EM, tendo em vista o grande número e gravidade de efeitos adversos. Dessa forma, torna-se importante pesquisas que busquem alternativas terapêuticas eficazes, tanto clinicamente como economicamente e que forneçam além da eficácia farmacológica menores efeitos adversos.

## **2.5. PRODUTOS NATURAIS COMO PROTÓTIPOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E IMUNOMODULADORES**

As plantas são utilizadas desde os primórdios da civilização humana para tratamento de diversas doenças (NEWMAN, CRAGG, 2012). A convivência e o aprendizado com os diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento de pesquisas em produtos naturais e de novos fármacos (TIRAPELLI et al., 2008). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais (BOECK, 2005).

Diante desse cenário, destaca-se o reino vegetal, que tem sido empregado a milhares de anos pela medicina popular de vários países (FABRICANT, FARNSWORTH, 2001). De um modo geral, as plantas produzem grande variedade de metabólitos secundários que são fundamentais para a sobrevivência, auxiliando-a durante seu desenvolvimento (MISHRA, TIWARI, 2011).

A bioprospecção do reino vegetal tem fornecido inúmeros exemplos de substâncias químicas bioativas que, direta ou indiretamente, se tornaram medicamentos. Como exemplo, pode-se citar o taxol, diterpeno isolado da casca de *Taxus brevifolia* (Taxaceae), protótipo mais promissor que surgiu da pesquisa de agentes antitumorais a partir de produtos naturais. Além do taxol, têm-se outros antitumorais oriundos de produtos naturais como os alcaloides isolados da *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), vincristina e vimblastina. Cabe mencionar ainda o composto antimalária mais promissor descoberto até hoje, a artemisinina,

lactona sesquiterpênica isolada da *Artemisia annua* (Asteraceae) (ARNOLD et al., 1990).

Como exemplos de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios obtidos de produtos naturais têm-se a morfina (analgésico), alcaloide extraído da planta *Papaver somniferum* (Papaveraceae) e o ácido acetilsalicílico, o qual foi produzido sinteticamente a partir da salicina, isolada das cascas do salgueiro (*Salix* sp) (BARREIRO, BOLZANO, 2009; COSTA, 2009).

Com relação à atividade imunomodulatória de produtos naturais, grande número de extratos vegetais e metabólitos isolados têm sido investigados, apresentado resultados promissores, os quais têm despertado interesse em todo o mundo como alternativa aos métodos terapêuticos tradicionais (FONTES et al., 2014; LIU ET al., 2014; CASTRO et al., 2012, DUTRA et al., 2012; CHEN et al., 2010).

Exemplo disso é o trabalho realizado por Chen e colaboradores (2010), no qual foi avaliada a ação imunomodulatória do ostol sobre o curso da EAE. O ostol (Figura 7a) é uma cumarina de reconhecida atividade anti-inflamatória e principal constituinte de *Cnidium monnier* (Umbelliferae). Pode-se mencionar ainda o trabalho realizado por Dutra e colaboradores (2012), que avaliou o potencial imunomodulador do eufol (Figura 7b), um triterpeno tetracíclico encontrado na planta brasileira conhecida como aveloz (*Euphorbia tirucalli*) e popularmente utilizada como anti-inflamatória. Nestes trabalhos, os autores evidenciaram que tais substâncias são protótipos naturais promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos para EM, tendo em vista que estes compostos foram capazes de limitar o desenvolvimento das características da EAE.

Outras classes de metabólitos secundários, além de cumarinas e terpenos, também têm sido estudados em modelos de EAE, como alcaloides e flavonoides.

No trabalho de Qin et al. (2010) e Liu e colaboradores (2014) investigou-se a atividade imunomodulatória de alguns alcaloides. Foi relatado que a berberina (Figura 7c), alcaloide isoquinolínico encontrado em espécies de *Berberis* e amplamente usada como anti-inflamatório na Medicina Tradicional Chinesa, mostrou-se ativa no experimento *in vivo* de EAE, atuando sobre mecanismos reguladores das células Th1 e Th17 (QIN et al., 2010). Outro alcaloide avaliado foi a matrina (Figura 7d), alcaloide quinolizidínico presente nas raízes de *Sophora flavescens*, o qual mostrou-se eficaz na melhora dos sinais clínicos da EAE,

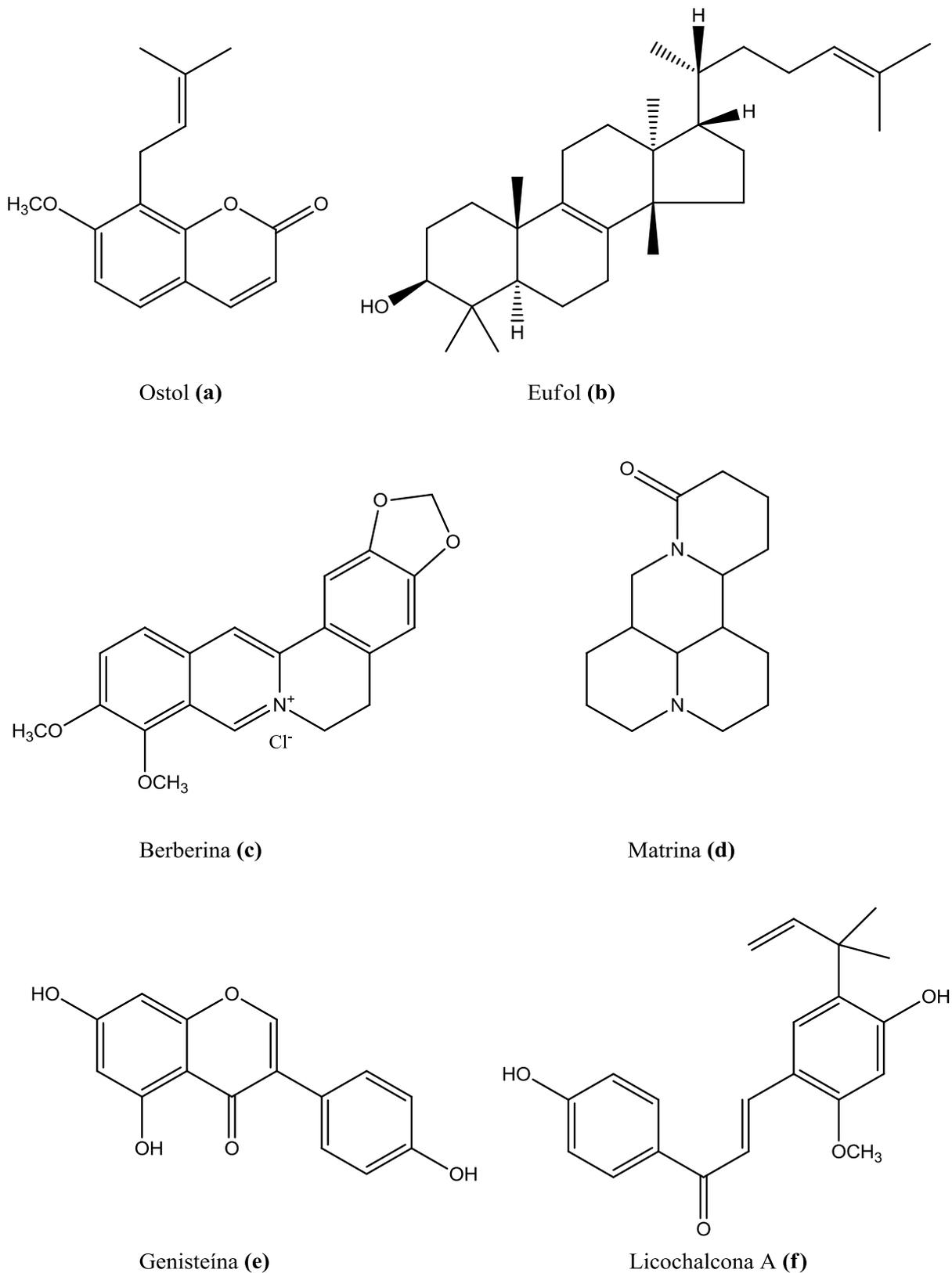
reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 (LIU et al., 2014).

Semelhante aos alcaloides, alguns flavonoides obtidos de espécies vegetais mostraram atividade imunomodulatória em modelos *in vitro* e *in vivo* de EAE. Genisteína (Figura 7e), isoflavonoide encontrado na soja, foi capaz de modular a resposta inflamatória *in vivo*, diminuindo a produção de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-6 e aumentar a produção de IL-10, melhorando, conseqüentemente, os sinais clínicos da EAE (CASTRO et al., 2012).

Outro flavonoide que tem despertado interesse da comunidade científica é a licochalcona A (Figura 7f), chalcona encontrada nas raízes de *Glycyrrhiza* sp, principalmente *G. inflata*. Muitos trabalhos demonstram seu potencial anti-inflamatório, atuando sobre diversas citocinas, principalmente naquelas envolvidas na imunopatogênese da EM e EAE (FUNAKOSHI-TAGO et al., 2008; FONTES et al., 2014).

Nos trabalhos de Chu e colaboradores (2012) e Furusawa e colaboradores (2009), avaliou-se o efeito anti-inflamatório da licochalcona A em modelos *in vitro* e *in vivo* induzidos por lipopolissacarídeo (LPS). Nestes estudos, verificou-se que esta chalcona pode regular significativamente a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1, nos dois modelos utilizados, através da inibição da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Além disso, outros estudos relatam a atividade anti-inflamatória da licochalcona A sobre a resposta Th17, inibindo a ativação do fator de transcrição STAT3, responsável pela produção de IL-17 (FUNAKOSHI-TAGO et al., 2008).

Tendo em vista a reconhecida atividade anti-inflamatória da licochalcona A, recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou seu efeito sobre o curso da EAE. Nossos resultados mostram que esta chalcona inibiu a produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 em camundongos C57Bl/6 com indução de EAE. Observou-se ainda a redução da severidade de EAE e melhora clínica nos animais tratados com licochalcona A. Diante dos resultados obtidos juntamente com os dados já publicados, sugerimos que esta substância pode desempenhar a modulação da resposta imune, através da ação em células Th1 e Th17, demonstrando assim seu potencial na terapêutica da EM (FONTES et al., 2014).



**Figura 7.** Exemplos de substâncias naturais com atividade imunomodulatória.

Diante do exposto, pode-se afirmar que as plantas são uma fonte potencial de substâncias químicas com várias atividades, dentre elas a atividade anti-inflamatória.

Essa afirmação aliada ao conhecimento de que produtos naturais com atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, podem ser ferramentas úteis para o desenvolvimento de protótipos para o tratamento de doenças autoimunes e neurodegenerativas (NABAS et al., 2009), ressalta-se a importância da avaliação da atividade imunomodulatória de extratos vegetais e metabólitos secundários isolados.

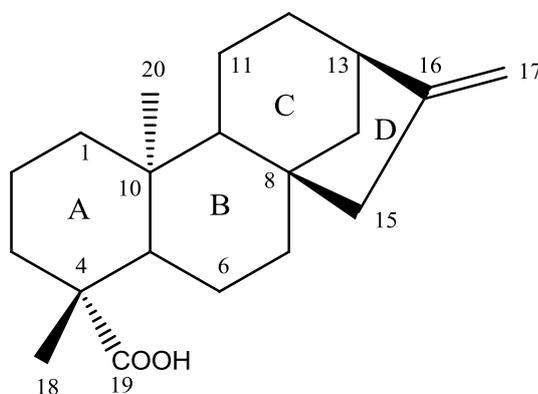
Desse modo, dentre os compostos naturais ativos com grande potencial farmacológico, principalmente sobre o sistema imune, destacam-se o ácido caurenico e o partenolido, os quais apresentam atividades biológicas de grande importância, especialmente a anti-inflamatória.

## 2.6. ÁCIDO CAURENOICO

O ácido ent(-)-caur-16-en-19-oico (ácido caurenico, Figura 8) é um diterpeno tetracíclico pertencente à classe dos cauranos.

Os terpenos são derivados de unidades isoprênicas e classificados de acordo com o número de unidades de isopreno presentes em sua estrutura. Desta forma, têm-se os monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades) e triterpenos (3 unidades). E os diterpenos, os quais são constituídos por quatro unidades de isopreno, apresentando 20 carbonos (SILVA, 2014).

Os diterpenos podem apresentar diversos esqueletos estruturais, dentre eles, o do tipo caurano. Na estrutura do ácido caurenico pode-se observar o esqueleto caurano, o qual apresenta uma unidade peridrofenantreno (anéis A, B e C) ligada, por uma ponte entre C8 e C13, a uma unidade ciclopentano (anel D) (DEWICK, 1997).



**Figura 8.** Estrutura química do ácido caurenico.

O ácido caurenico é encontrado em várias espécies de plantas medicinais, dentre elas *Mikania glomerata* Sprengel e *M. laevigata* Schultz Bip (Asteraceae), popularmente conhecidas como guaco (RUFATTO et al., 2013). Outros trabalhos também descrevem seu isolamento dos frutos verdes de *Xylopiá frutescens* Aubl. (Annonaceae), *X. brasiliensis*, *X. aromática* e das folhas e cascas de *Annona glabra* (Annonaceae), além das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (Asteraceae) (MELO et al., 2001; BATISTA et al., 2010; MATSUMOTO et al., 2014). O ácido caurenico também foi isolado dos óleos de copaíbas (*Copaifera* sp., família Fabaceae) (GELMINI et al., 2013). E ainda, há relatos do isolamento desta substância de 4 espécies de *Smallanthus* (ARÁOZ et al., 2010). A tabela 2 sumariza a ocorrência do ácido caurenico em diferentes espécies e a sua concentração em cada parte da planta.

Tabela 2. Teores de ácido caurenico em diferentes espécies de plantas

<b>Espécie vegetal</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Referências</b>
<i>Mikania glomerata</i>	Partes aéreas	0,20	VILEGAS et al., 1997
	Flores	0,10	
	Folhas	0,11	
<i>Wedelia paludosa</i>	Caule	0,50	BRESCIANI et al., 2000
	Partes aéreas	0,85	BATISTA et al., 2005
<i>Annona glabra</i>	Cascas	0,53	OLIVEIRA et al., 2002
	Folhas	0,27	
<i>Xylopiá brasiliensis</i>	Folhas	0,01	MELO et al., 2001
<i>Xylopiá aromática</i>	Folhas	0,02	
<i>Xylopiá frutescens</i>	Folhas	0,01	
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	Raízes tuberosas	0,74	ARÁOZ et al., 2010
<i>Smallanthus siegesbeckius</i>	Raízes tuberosas	0,51	
<i>Smallanthus connatus</i>	Raízes tuberosas	0,71	
<i>Smallanthus macroscyphus</i>	Raízes tuberosas	0,73	

*S. sonchifolius* (Poepp & Endl.), conhecida como yacon, foi originalmente classificada como *Polymnia* por Linnaeus em 1751. Na primeira revisão moderna do

gênero realizada por Wells (1965), a planta foi mantida neste gênero, porém mais tarde Robinson (ROBINSON, 1978) dividiu o gênero em dois: *Polymnia* e *Smallanthus*, a partir de então, yacon passou a pertencer ao gênero *Smallanthus*. Apesar de muitos autores referirem-se ao yacon como parte do gênero *Polymnia* a nova classificação, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp & Endl.) é preferencialmente aceita, enquanto o nome antigo *Polymnia sonchifolia* Poepp & Endl é considerado como sinônimo (VALENTOVÁ, ULRICHOVÁ, 2003).

É uma espécie nativa da região dos Andes, mas há relatos do seu cultivo em outras regiões, incluindo Estados Unidos, Europa e Nova Zelândia (OJANSIVU et al., 2011). No Brasil, o yacon começou a ser cultivado em 1991 (MOURA et al., 2012), sendo produzido e comercializado no estado de São Paulo e agora também na região do Itajaí, no estado do Rio Grande do Sul e em outros estados como Minas Gerais (MARANGONI, 2007).

As raízes tuberosas são utilizadas como alimento e na medicina popular, principalmente, no tratamento do diabetes. Essas raízes são ricas em fruto-oligossacarídeos - FOS do tipo inulina que conferem a planta propriedades dietéticas e prébióticas (MOURA et al., 2012). Além da atividade hipoglicemiante e prebiótica, muitos estudos têm demonstrado que as raízes de yacon também possuem propriedade antioxidante, relacionada, além dos FOS, ao conteúdo fenólico (SIMONOVSKA et al., 2003; LACHMAN et al., 2007), e antimicrobiana, relacionada aos derivados terpenoides, como o ácido caurenico (PADLA et al., 2012).

Estudos anteriores realizados demonstraram várias atividades biológicas relacionadas ao ácido caurenico, como antimicrobiano e antifúngico (COTORAS et al., 2004; PADLA et al., 2012), antiespasmódico (AMBROSIO et al., 2004) e tripanocida (IZUMI et al., 2012). Há ainda evidências científicas que relatam o efeito vasorelaxante do ácido caurenico via óxido nítrico/monofosfato de guanosina cíclico (cGMP)/proteína quinase G (PKG)/canais de cálcio e potássio sensíveis à ATP, dependendo do modelo experimental (TIRAPELLI et al., 2004).

Em relação ao ácido caurenico, numerosos pesquisadores têm reportado também atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias a esse diterpeno, sugerindo que tais atividades ocorrem pela modulação da expressão dos níveis de várias citocinas, incluindo IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , NO e *i*NOS (MIZOKAMI et al., 2012; DIAZ-VICIEDO et al., 2008; TIRAPELLI et al., 2004).

No trabalho de Diaz-Viciedo e colaboradores (2008) o ácido caurenico inibiu *in vitro* a produção de NO, PGE<sub>2</sub> e TNF- $\alpha$  em linhagens de macrófagos RAW 264,7 além de diminuir o edema de orelha e o infiltrado inflamatório em camundongos.

Semelhantemente, no trabalho de Choi e colaboradores (2011), o ácido caurenico inibiu a produção de mediadores químicos, tais como PGE<sub>2</sub>, NO, assim como a expressão de COX-2 e *iNOS* de linhagens de macrófagos RAW 264,7 ativadas por LPS. Neste mesmo estudo, verificou-se que a inibição da expressão de COX-2 e *iNOS* está provavelmente relacionada à inibição da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.

O NF-  $\kappa$ B é parte importante de uma via de sinalização, com um papel crucial na regulação de grande número de genes envolvidos na resposta inflamatória e sobrevivência celular, incluindo a elaboração de citocinas pró-inflamatórias, morte celular, proteínas de sobrevivência e moléculas de adesão intercelular (MALEK et al., 2007). Zhang e colaboradores (2009) relataram que a ativação de NF- $\kappa$ B desempenha papel central na regulação do gene transcrição de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, *iNOS* durante o processo inflamatório. Estudos realizados recentemente, verificaram que inibidores de NF- $\kappa$ B diminuem a inflamação no modelo animal de encefalomielite autoimune experimental, confirmando assim seu papel fundamental na inflamação (LUNIN et al., 2013; FENG et al., 2014).

Corroborando com o exposto acima, Hueso-Falcón e colaboradores (2011) demonstraram que diversos derivados do ácido caurenico inibiram a produção das citocinas IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por esplenócitos de camundongos BALB/c, sugerindo que tal inibição ocorreria pelo mecanismo de inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.

Adicionalmente aos experimentos *in vitro*, o ácido caurenico também tem sido utilizado em vários estudos *in vivo*, em um destes, o ácido caurenico foi administrado intraperitonealmente e por via oral, promovendo a inibição da nocicepção inflamatória induzida por ácido acético. O mesmo grupo de pesquisa avaliou seu efeito em modelos de inflamações aguda por carragenina e crônica por CFA, nos quais o ácido caurenico foi capaz de diminuir a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 (MIZOKAMI et al., 2012).

No trabalho de Sosa-sequera e colaboradores (2010), utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por CFA e por ovalbumina em ratos Lewis, e estes edemas

se mostraram reduzidos nos animais tratados com ácido caurenóico. Já no estudo de Boller e colaboradores (2010), utilizou-se o edema de orelha induzido por capsaicina, no qual o ácido caurenóico diminuiu a migração de células porlinmorfonucleares. Na colite induzida em ratos Lewis a substância em questão foi administrada por via oral nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia e além da melhora clínica os animais apresentaram marcada diminuição de infiltrado inflamatório, bem como diminuição de edemas na submucosa no segmento do colon dos animais com a colite (PAIVA et al., 2002).

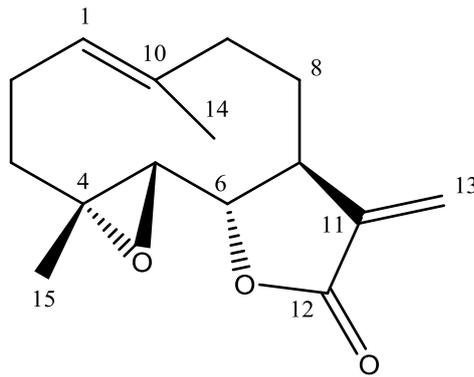
Dessa forma, considerando que o ácido caurenóico foi capaz de modular a resposta inflamatória em diversos modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, inibindo principalmente a produção de NO, COX-2, PGE<sub>2</sub>, iNOS, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , além da inibição da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, torna-se relevante estudar seus possíveis efeitos imunomodulatórios sobre a resposta inflamatória em camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos.

## 2.7. PARTENOLIDO

O partenolido (Figura 9) é uma lactona sesquiterpênica da classe dos germacrolídeos.

As lactonas sesquiterpênicas são sesquiterpenos, oriundas de três unidades de isopreno, que apresentam um grupo lactona em seu esqueleto carbônico. A união dessas 3 unidades de isopreno formam o germacreno, precursor de todas as lactonas sesquiterpênicas. No partenolido a formação do anel lactônico se dá através da oxidação regioespecífica no C12 e a incorporação de um grupo hidroxila no C6, direcionando a lactonização nesses carbonos (DEWICK, 1997).

Assim, forma-se o partenolido, com anel  $\alpha$ -metileno  $\gamma$ -lactona e grupamento epóxido, os quais interagem com os diferentes alvos biológicos (LIU et al., 2014). O partenolido foi isolado pela primeira vez de *Tanacetum parthenium* em 1961 por Soucek e colaboradores (1961). O seu teor na planta varia com o crescimento e desenvolvimento desta, sendo superior nas folhas em crescimento vegetativo e início do florescimento (HENDRIKS et al., 1997). No estudo conduzido por Heptinstall e colaboradores (1992) o maior teor de partenolido foi encontrado nas flores (1,38%), seguido das folhas (0,95%) e apenas 0,08% em caules e raízes.



**Figura 9.** Estrutura química do partenolido.

A espécie *Tanacetum parthenium* L. Bernh., sinonímia *Chrysanthemum parthenium* (L.) Schultz.-Bip., pertence à família Asteraceae (Compositae), a segunda maior família de angiospermas e ao gênero *Tanacetum*, o qual compreende cerca de 150-200 espécies. A espécie é nativa no Sudeste Europeu e Ásia Menor, cultivada na maior parte da Europa, e em alguns países da América e África, incluindo o Brasil (BROWN et al., 1999).

Nos Estados Unidos, Europa e Nova Zelândia é mais conhecida como "feverfew", devido a sua utilização mais tradicional como antipirética. No Brasil, é mais conhecida como artemísia, sendo também comuns as denominações de tanaceto, monsenhor-amarelo, piretro-do-caucaso, margaridinha, matricária, artemijo, artemigem, macela-do-reino, camomila-pequena, macela-da-serra, artemigem-dos-jardins e olguinha (CARVALHO, 2009).

*T. parthenium* tem um longo histórico no uso de suas folhas e flores no tratamento fitoterápico, como analgésico e anti-inflamatório o que levou alguns autores denominarem-na "aspirina medieval" (HEWLETT et al., 1996). Tradicionalmente, tem sido utilizada para o tratamento da enxaqueca, zumbido, tontura, artrite, febre, distúrbios menstruais, dificuldade durante o parto, dores de estômago, dores de dente, e picadas de insetos (NEWALL et al., 2002). Seu uso terapêutico, particularmente contra enxaqueca e artrite, tem sido popularizado em tal extensão, que vários tipos de preparações comerciais dela obtidas, inclusive folhas desidratadas e moídas, estão à venda em muitas farmácias e lojas de produtos naturais, em várias partes do mundo, sendo correntemente utilizadas como fitoterápico (DOLMAN et al., 1992; WILLIAMS et al., 1995).

Durante os últimos 15-20 anos, a espécie *T. parthenium* tem recebido considerável atenção em razão, principalmente, das suas propriedades profiláticas

com respeito à frequência e severidade dos ataques de enxaqueca (HEWLETT et al., 1996). Estudos fitoquímicos relatam que extratos de artemísia contêm grande variedade de metabólitos secundários, como esteróis, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e taninos (KAPLAN et al., 2002). No entanto, estudos recentes têm indicado que dentre as 30 lactonas sesquiterpênicas já identificadas na referida espécie e os outros metabólitos supracitados, o partenolido é o marcador químico e a principal substância farmacologicamente ativa, correspondendo a 85% do total de sesquiterpenos (MAJDI et al., 2011).

Ao partenolido têm sido descritas diversas atividades biológicas, como tratamento da enxaqueca (KIM et al., 2012), antimicrobiano e antiparasitário (BLAKEMAN, ATKINSON, 1979; IZUMI et al., 2008), além da atividade antireumática e anti-inflamatória (PFAFFENRATH et al., 2002).

Ao longo de duas décadas, muito se descobriu sobre a capacidade do partenolido em induzir a apoptose em diferentes células cancerígenas, incluindo células humanas de carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão e câncer de estômago. E após muitas pesquisas foi confirmado que tal efeito apoptótico está associado à inibição do fator nuclear NF- $\kappa$ B, do STAT3, além do maior stress oxidativo gerado (KIM et al., 2013).

Estudos têm evidenciado também a atividade antiparasitária desempenhada pelo partenolido. Tiuman e colaboradores (2005) avaliaram a atividade contra *Leishmania amazonensis* e verificaram que o composto foi capaz de inibir a proliferação do parasita e reduzir a sobrevivência das formas intracelulares, ambos em concentrações baixas, sem apresentar toxicidade às células hospedeiras. Semelhantemente, no estudo conduzido por Izumi e colaboradores (2008) o partenolido inibiu a proliferação das formas epimastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Além das propriedades já citadas, o partenolido tem sido extensivamente estudado em relação à sua atividade anti-inflamatória, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*.

No estudo conduzido por Magni e colaboradores (2012) utilizou-se células do SNC. Essas células de microglia foram colocadas em culturas e estimuladas por LPS, posteriormente foram tratadas com diferentes concentrações de partenolido. Nas concentrações de 1 e 5  $\mu$ M, o partenolido foi capaz de inibir a produção de IL-6 em 48% e 98%, respectivamente. Além disso, na maior concentração avaliada de

partenolido (5  $\mu$ M), a produção de TNF- $\alpha$  foi reduzida em 54%. Ainda sobre células do SNC, Zou, Crews (2012) demonstraram que inflamação induzida por etanol afeta a neurogênese e que neste modelo experimental a utilização do partenolido inibe a IL-1 $\beta$  induzida por etanol, mostrando-se um importante caminho para se reestabelecer a neurogênese.

De forma semelhante, em estudos *in vivo* o partenolido também se mostra promissor no tratamento de doenças inflamatórias. Smolinski, Pestka (2005) realizaram experimentos *in vivo* demonstrando que o partenolido reduz a expressão gênica de interleucinas (IL-6 e IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  e COX-2 em órgãos como baço e fígado. Já no estudo de Zhao e colaboradores (2012), o modelo utilizado foi o da colite ulcerativa, no qual observou-se que os animais após o tratamento com partenolido tiveram redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e melhora dos aspectos histológicos.

Muitos autores sugerem que a atividade anti-inflamatória exercida pelo partenolido ocorra através da inibição do fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B). Estudos mostram que tal inibição é através da alquilação de um resíduo de cisteína p65 na subunidade NF- $\kappa$ B, o qual é necessário para a ligação com o DNA (GARCIA-PINERES et al., 2004).

O complexo NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes incluindo citocinas, moléculas de adesão celular, proteínas antiproliferativas e inibidores de apoptose. Entre as citocinas ligadas ao NF- $\kappa$ B estão, por exemplo, IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , entre outras. Este complexo (NF- $\kappa$ B) também está intimamente ligado a quimiocinas, moléculas de adesão (ICAM, VCAM), enzimas indutoras (COX-2, *i*NOS), fatores de crescimento, proteínas de fase aguda e receptores do sistema imune (UCHIBORI et al., 2013).

Considerando o papel do NF- $\kappa$ B como um mediador intracelular da inflamação, é esperado que sua inibição exerça um possível efeito anti-inflamatório, através da regulação de várias citocinas importantes nesta resposta. No trabalho de Li e colaboradores (2006) observou-se que o partenolido inibiu, em linhagens de macrófagos RAW 264,7 estimulados por LPS, a ativação do complexo NF- $\kappa$ B, inibindo a expressão de diversas citocinas avaliadas, dentre elas as interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ .

No entanto, outros estudos afirmam que a atividade anti-inflamatória exercida por algumas lactonas sesquiterpênicas ocorra através da alquilação de um resíduo

de cisteína da alça de ativação da I $\kappa$ B quinase (IKK), impedindo assim a fosforilação e degradação de I $\kappa$ B, um passo necessário para a ativação do NF- $\kappa$ B (HEHNER et al., 1999).

Em células não estimuladas, o NF- $\kappa$ B é retido no citoplasma através da interação com o seu inibidor I $\kappa$ B. Em resposta a vários estímulos pró-inflamatórios, o I $\kappa$ B é fosforilado pelo complexo I $\kappa$ B quinase (IKK), levando a degradação do inibidor I $\kappa$ B, permitindo assim a translocação do NF- $\kappa$ B ao núcleo, onde irá regular a expressão de centenas de genes que são importantes na resposta inflamatória (YAMAOKA et al., 1998). No trabalho publicado por Kwok e colaboradores (2001) foi demonstrado que o partenolido se liga ao I $\kappa$ B quinase inibindo-o. Tal ligação se dá na subunidade catalítica IKK $\beta$ , impedindo assim a ativação do complexo NF- $\kappa$ B. Além disso, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou ainda que a atividade anti-inflamatória do partenolido tanto *in vitro* como *in vivo* é mediada através do anel  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona.

Como descrito anteriormente, o óxido nítrico está implicado na patogênese da EAE e a COX-2 em processos inflamatórios e imunomodulatórios, nesse sentido vários pesquisadores têm avaliado o efeito do partenolido sobre a produção destes mediadores. Nestes estudos observou-se que o partenolido apresenta efeito inibitório sobre a enzima COX-2 e *iNOS* (RUMMEL et al., 2011; GRECO et al., 2012).

Além do efeito amplamente relatado sobre a via NF- $\kappa$ B, e efeito inibitório da enzima COX-2 e *iNOS*, estudos recentes mostram que o partenolido também apresenta forte inibição de STAT3 (CARLISI et al., 2011; SKOUMAL et al., 2011), um sinalizador de tradução e ativador de transcrição. Este mensageiro encontra-se ativado em uma série de tumores (CARLISI et al., 2011.; SKOUMAL et al., 2011) bem como na produção de IL-17, interleucina diretamente ligada à patogênese da EAE (ZHOU et al., 2007; WEI et al., 2007).

Portanto, diante do exposto e tendo-se em vista que muitas pesquisas apontam que a supressão conjunta Th1 e Th17 promovem uma melhora clínica considerável na EAE, observando-se diminuição de infiltrados inflamatórios no SNC, preservação das áreas mielinizadas, redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e radicais de oxigênio em animais com EAE (CORRÊA et al., 2010 e PERON et al., 2010), torna-se relevante estudar seus possíveis efeitos anti-inflamatórios na modulação da resposta inflamatória em camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos.

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos imunomodulatórios *in vitro* do ácido caurenico e do partenolido sobre esplenócitos obtidos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos.

Para estes propósitos, os objetivos específicos do trabalho foram:

- Obter o extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de *Smallanthus sonchifolius* e o extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *Tanacetum parthenium*;
- Realizar o isolamento, a purificação e a identificação do ácido caurenico e do partenolido presentes nos extratos supracitados;
- Avaliar os efeitos do ácido caurenico e do partenolido sobre a produção das citocinas IL-17, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  em culturas de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos;
- Avaliar os efeitos do ácido caurenico e do partenolido sobre a produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos;
- Avaliar os efeitos citotóxicos do ácido caurenico e do partenolido em células peritoneais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAIS CROMATOGRÁFICOS

O Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora dispôs dos seguintes equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho:

- Rotaevaporador *Buchi* RII
- Bomba *Buchi* V-700
- Câmara UV SL-204 Solab ( $\lambda = 254$  e  $366$  nm)
- Balança analítica (Marte AY220)
- Estufa com circulação de ar (Solab SL102)

O grau de pureza dos solventes utilizados variou de acordo com a finalidade:

- para as extrações e sistemas cromatográficos, utilizaram-se solventes de grau P.A., das marcas Vetec, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quemis, Isofar e Alphatec

- para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizaram-se solventes ultrafiltrados, grau HPLC, das marcas Alphatec e JTBaker

O tipo de fase estacionária utilizada nos processos cromatográficos variou de acordo com a separação desejada:

- para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck, com espessura de 0,25 mm.

- para cromatografia líquida à vácuo (CLV) utilizou-se como adsorvente sílica gel (partículas de 60-230  $\mu\text{m}$ , Aldrich),

- para cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em coluna *flash* utilizou-se como adsorvente sílica gel (partículas de 40-63  $\mu\text{m}$ , Aldrich), empregando-se colunas de vidro de diferentes alturas e diâmetros, contendo placa sinterizada de 2,5 cm de altura.

- para as revelações dos cromatogramas obtidos em placas comparativas utilizaram-se vapores de iodo, solução de anisaldeído sulfúrico, solução de vanilina em ácido sulfúrico e/ou irradiação no UV (254 e 366 nm).

- as análises qualitativas por CLAE foram realizadas em coluna analítica de fase reversa (Sun Fire<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>; 4,6 x 250 mm; 5  $\mu\text{m}$ ), na presença de coluna guarda

(Sun Fire™ C<sub>18</sub>; 4,6 x 20 mm; 5 µm), empregando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Waters) composto por duas bombas (modelo 1525), injetor automático (modelo 2707) e detector de arranjo de diodos PDA (modelo 2998). A aquisição de dados e controle foi feita pelo *software* Empower 3 Waters Corporation.

#### **4.2. COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DA EXSICATA**

As raízes tuberosas de *S. sonchifolius* foram coletadas em 24 de julho de 2013 no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. A exsicata do vegetal foi depositada no Herbário VIC – Viçosa, da UFV, sob número de tombo 41.713, e identificada por Fernanda Lobão Gotti.

As partes aéreas de *T. parthenium* foram coletadas em 24 de outubro de 2013 no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. A exsicata do vegetal foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ, da UFJF, sob número de tombo CESJ 65105.

#### **4.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DAS RAÍZES TUBEROSAS DE *S. sonchifolius***

As raízes tuberosas de *S. sonchifolius* foram cortadas em pequenos pedaços e estas foram levadas à estufa a 45 °C para secagem do material vegetal. Após secagem, o material obtido foi triturado com auxílio de moinho de facas, resultando em 1800 g de pó. O pó assim obtido foi submetido à maceração em clorofórmio.

As soluções clorofórmicas obtidas foram filtradas e, em seguida, transferidas para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 45 ± 5 °C. Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados fornecendo 24,07 g de extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de *S. sonchifolius* (Ss).

##### **4.3.1. Isolamento do ácido caurenico das raízes tuberosas de *S. sonchifolius***

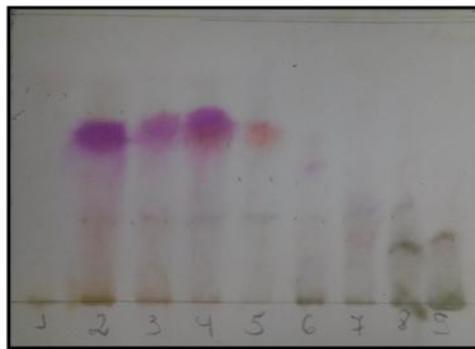
Com o intuito de separação inicial dos constituintes presentes no Ss, 22 g deste extrato foi submetido à CLV de 10 cm de diâmetro por 9 cm de altura,

empacotada com 310 g de sílica gel (60-230  $\mu\text{m}$ ). Utilizou-se como fase móvel a mistura de hexano:acetato de etila:metanol em grau crescente de polaridade, sendo coletadas 9 frações de aproximadamente 1500 mL cada (Tabela 3).

Tabela 3. Frações obtidas por CLV da fração Ss.

Eluentes	Frações	Massas (g)
Hexano 100%	Ss-1	0,055
Hex:AcOEt 10%	Ss-2	2,189
Hex:AcOEt 10%	Ss-3	0,487
Hex:AcOEt 10%	Ss-4	0,255
Hex:AcOEt 10%	Ss-5	0,869
Hex:AcOEt 30%	Ss-6	1,455
Hex:AcOEt 50%	Ss-7	1,476
AcOEt 100%	Ss-8	1,028
AcOEt:MeOH 80%	Ss-9	1,176

Realizou-se a CCD das frações obtidas da CLV do extrato Ss, utilizando como sistema eluente, hexano:acetato de etila (1:1 v/v), revelando em luz UV no comprimento de onda 254nm e posteriormente em anisaldeído (Figura 10). A partir da análise cromatográfica, foi possível sugerir a presença do constituinte de interesse nas frações 2, 3 e 4. Para isolamento de tal substância, estas frações foram reunidas, passando a ter o código Ss<sub>(2-4)</sub>, e posteriormente submetida a outro processo de fracionamento.



**Figura 10.** CCD das frações obtidas da CLV do extrato Ss.

Fase móvel: Hex:AcOEt (1:1 v/v); revelador: anisaldeído

#### 4.3.1.1. Fração Ss<sub>(2-4)</sub>

A fração Ss<sub>(2-4)</sub> (2,931 g) foi submetida a cromatografia em coluna flash de 4 cm de diâmetro e 18 cm de altura, empacotada com 95 g de sílica gel (40-63  $\mu\text{m}$ ).

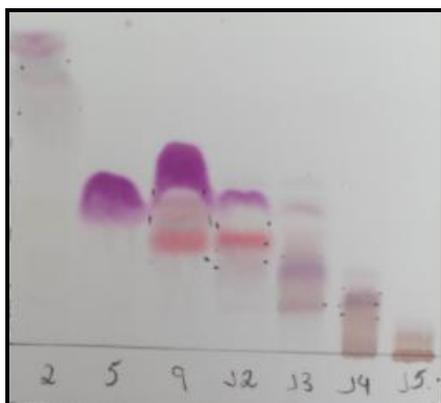
Foram recolhidas 15 sub-frações de 100 ml cada, utilizando-se como eluentes a mistura de hexano:acetato de etila. Após análise das sub-frações, por meio de CCD, foi possível agrupá-las em 7 sub-frações, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Sub-frações obtidas por cromatografia flash da fração  $Ss_{(2-4)}$ .

Eluentes	Sub-frações	Massas (g)
Hex:AcOEt 10%	$Ss_{(2-4)}$ -2	0,271
Hex:AcOEt 10%	$Ss_{(2-4)}$ -5	0,548
Hex:AcOEt 10%	$Ss_{(2-4)}$ -9	0,186
Hex:AcOEt 20%	$Ss_{(2-4)}$ -12	0,146
Hex:AcOEt 20%	$Ss_{(2-4)}$ -13	0,117
Hex:AcOEt 50%	$Ss_{(2-4)}$ -14	0,547
AcOEt 100%	$Ss_{(2-4)}$ -15	0,291

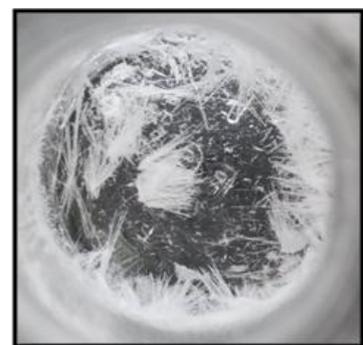
Realizou-se a CCD das sub-frações obtidas da cromatografia em coluna flash da sub-fração  $Ss_{(2-4)}$ , utilizando como sistema eluente, hexano:acetato de etila (9:1 v/v), e revelando em luz UV no comprimento de onda de 254nm e posteriormente em anisaldeído (Figura 11).

De acordo com a análise do perfil cromatográfico das sub-frações resultantes, observou-se que a sub-fração  $Ss_{(2-4)}$ -5 apresentava como uma única mancha na CCD. A substância isolada apresentou-se na forma de cristais brancos (Figura 12) e para determinação da sua estrutura química, a mesma foi avaliada por RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ .

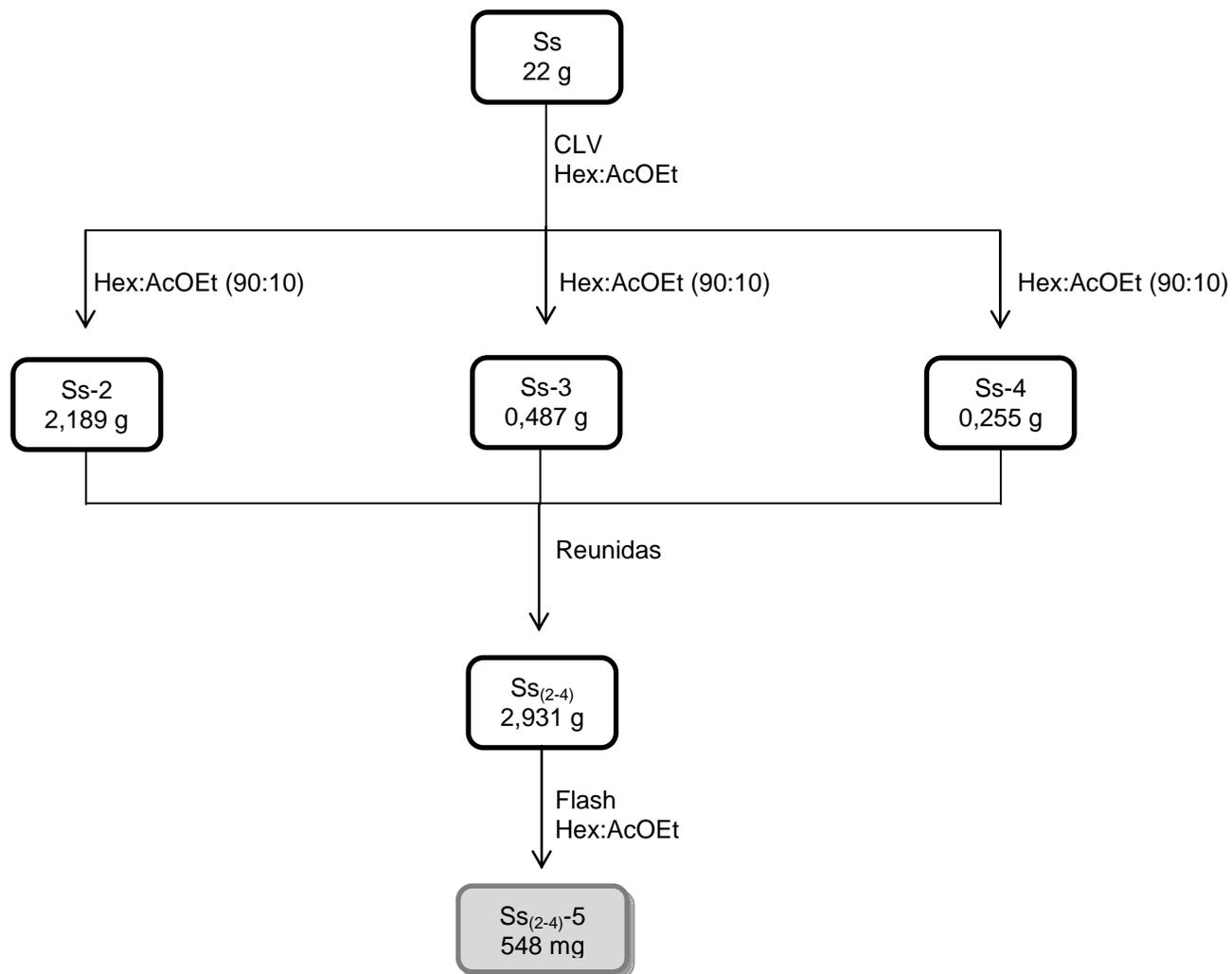


**Figura 11.** CCD das sub-frações obtidas da cromatografia flash da fração  $Ss_{(2-4)}$ .

Fase móvel: Hex:AcOEt (9:1 v/v);  
revelador: anisaldeído



**Figura 12.** Substância isolada da fração  $Ss_{(2-4)}$ -5.



**Figura 13.** Fluxograma demonstrativo do isolamento do  $Ss_{(2-4)-5}$  do extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de *S. sonchifolius*

#### **4.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *T. parthenium***

As partes aéreas de *T. parthenium* foram secas à sombra, à temperatura ambiente e posteriormente levada à estufa a 45 °C para finalizar o processo de secagem. Após secagem, o material vegetal foi submetido à moagem para obtenção do pó. O pó assim obtido (1983 g) foi submetido à maceração em etanol: água (9:1 v/v).

As soluções hidroalcoólicas obtidas foram filtradas e, em seguida, transferidas para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 45 ± 5 °C. Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados fornecendo 32 g de extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *T. parthenium* (Tp).

##### **4.4.1. Isolamento do partenolido das partes aéreas de *T. parthenium***

Com o intuito de retirar parte da clorofila presente no Tp, cerca de 25 g do extrato foi submetido ao processo de filtração com carvão ativo.

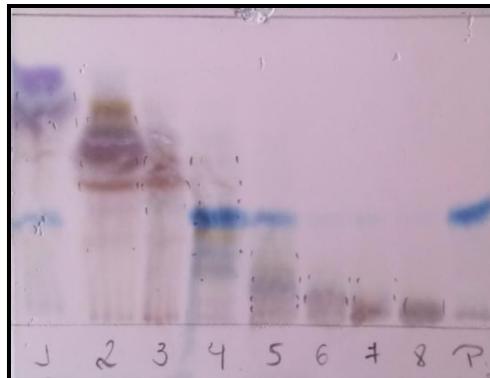
Para tal procedimento, 25 gramas de carvão foram colocados em estufa de circulação de ar, à 40 °C por 1 hora e, posteriormente este foi adicionado ao Tp. Para empacotamento da coluna de 10 cm de diâmetro por 8 cm de altura, utilizou-se 350 g de celite, e a mistura de carvão ativado e Tp foi submetida à passagem por este sistema. Após a filtração, recolheu-se uma fração que, em seguida, foi transferida para balão de fundo redondo e concentrada com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 45 ± 5 °C, rendendo 15 g do extrato bruto hidroalcoólico filtrado das partes aéreas de *T. parthenium*, o qual passou a ter o código de TpF.

Prosseguindo com o processo de isolamento do partenolido, a fração TpF (15 g) foi submetida à CLV de 10 cm de diâmetro por 9 cm de altura, empacotada com 310 g de sílica gel (60-230 µm), utilizando-se como eluentes a mistura de hexano:acetato de etila:diclorometano em grau crescente de polaridade, sendo coletadas 8 frações de aproximadamente 2000 mL cada (Tabela 5).

Tabela 5. Frações obtidas por CLV da fração TpF.

Eluentes	Frações	Massas (g)
Hex:AcOEt 5%	TpF-1	0,173
Hex:AcOEt 15%	TpF -2	0,410
Hex:AcOEt 25%	TpF -3	0,756
Hex:AcOEt 40%	TpF -4	1,300
Hex:AcOEt 40%	TpF -5	0,663
Hex:AcOEt 55%	TpF -6	0,293
Hex:AcOEt 80%	TpF -7	0,520
DCM 100%	TpF -8	0,100

Realizou-se a CCD das frações obtidas da CLV do extrato TpF, utilizando como sistema eluente, hexano:acetato de etila (6:4 v/v), revelando em luz UV no comprimento de onda 254nm e posteriormente em anisaldeído (Figura 14). A partir da análise cromatográfica e comparação com o perfil do padrão de partenolido, foi possível sugerir a presença do constituinte de interesse nas frações 4 e 5. Para isolamento de tal substância, estas frações foram reunidas, passando a ter o código TpF<sub>(4-5)</sub>, e posteriormente submetida a outro processo de fracionamento.



**Figura 14.** CCD das frações obtidas da CLV do extrato TpF.

Fase móvel: Hex:AcOEt (6:4 v/v); revelador: anisaldeído

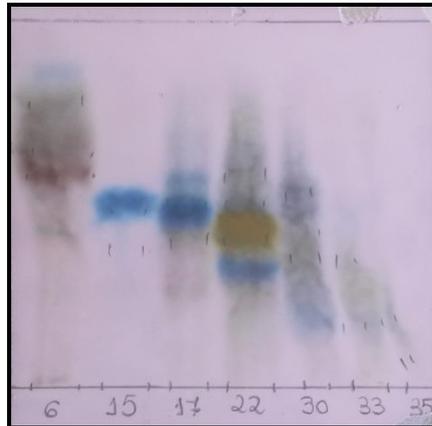
#### 4.4.1.1. Fração TpF<sub>(4-5)</sub>

A fração TpF<sub>(4-5)</sub> (1,963 g) foi submetida a cromatografia em coluna clássica de 4 cm de diâmetro e 18 cm de altura, empacotada com 30 g de sílica gel (40-63 µm). Foram recolhidas 35 sub-frações de 100 mL cada, utilizando-se como eluentes a mistura de clorofórmio:acetona. Após análise das sub-frações, por meio de CCD, foi possível agrupá-las em 7 sub-frações, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6. Sub-frações obtidas por CC da fração TpF<sub>(4-5)</sub>.

Eluentes	Sub-frações	Massas (g)
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 0,5%	TpF <sub>(4-5)</sub> -6	0,293
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 0,5%	TpF <sub>(4-5)</sub> -15	0,152
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 0,5%	TpF <sub>(4-5)</sub> -17	0,039
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 2%	TpF <sub>(4-5)</sub> -22	0,232
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	TpF <sub>(4-5)</sub> -30	0,574
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	TpF <sub>(4-5)</sub> -33	0,159
Me <sub>2</sub> CO 100%	TpF <sub>(4-5)</sub> -35	0,038

Realizou-se a CCD das sub-frações obtidas da cromatografia clássica da fração TpF<sub>(4-5)</sub>, utilizando como sistema eluente, hexano:acetato de etila (1:1 v/v), revelando em luz UV no comprimento de onda 254nm e posteriormente em anisaldeído (Figura 15).

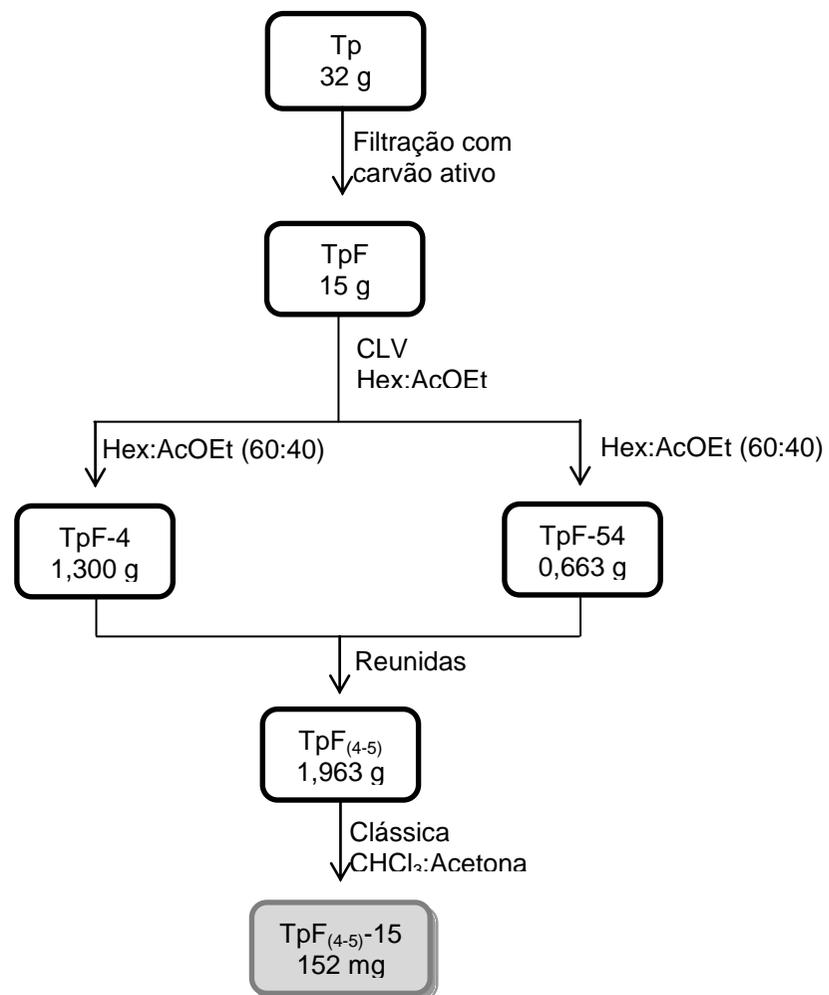


**Figura 15.** CCD das sub-frações obtidas da CC da fração TpF<sub>(4-5)</sub>.  
Fase móvel: Hex:AcOEt (1:1 v/v); revelador: anisaldeído

De acordo com a análise do perfil cromatográfico das sub-frações resultantes, observou-se que a sub-fração TpF<sub>(4-5)</sub>-15 apresentava como uma única mancha na CCD. A substância isolada apresentou-se como um pó branco (Figura 16) e para determinação da sua estrutura química, a mesma foi avaliada por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.



**Figura 16.** Substância isolada da fração TpF<sub>(4-5)</sub>-15.



**Figura 17.** Fluxograma demonstrativo do isolamento do  $TpF_{(4-5)-15}$  do extrato bruto hidroalcolóico das partes aéreas de *T. parthenium*

#### **4.5. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS**

Os compostos isolados foram identificados por meio da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e também pela comparação com a literatura. A obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi realizada no Departamento de Química da UFJF, registrados no espectrômetro BRUCKER ASCEND<sup>TM</sup>500, operando a 500 MHz para hidrogênio e a 125 MHz para carbono. Como referência interna, utilizou-se o tetrametilsilano (TMS). Os valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) são referidos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Utilizou-se clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para solubilização dos compostos isolados.

#### **4.6. CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIODOS (CLAE-DAD)**

O extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de *S. sonchifolius* (Ss) e o ácido caurenico proveniente deste extrato, assim como o extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *T. parthenium* (Tp) e o partenolido foram analisados por CLAE. Todas as amostras foram diluídas em metanol grau HPLC de forma a obter uma concentração de 2mg/mL. Foram injetados 15  $\mu\text{L}$  do ácido caurenico e partenolido e 50  $\mu\text{L}$  dos extratos Ss e TpF.

Para análise do Ss e ácido caurenico utilizou-se um sistema gradiente linear que consistiu de uma fase móvel:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5% em água (A) e acetonitrila (B), variando de 60 a 100% de B (0 - 30 min), mantendo os 100% até 40 min, com fluxo de fase a 1 mL/min. Já para TpF e partenolido a fase móvel consistiu em um sistema gradiente linear de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5% em água (A) e acetonitrila (B), variando de 40 a 100% de B (0 - 30 min), com fluxo de fase a 1 mL/min. Foi realizado um monitoramento utilizando-se o detector UV em varredura entre 190 a 400 nm, sendo selecionada a leitura no comprimento de onda de 200 nm.

#### **4.7. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO E DO PARTENOLIDO SOBRE A PRODUÇÃO DE MEDIADORES QUÍMICOS DA EAE**

##### **4.7.1. Animais de experimentação**

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6 fêmeas, com 8-12 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Eles permaneceram na sala de manutenção de animais do Laboratório de Biofarmácia da Faculdade de Farmácia, em estantes climatizadas e dieta *ad libitum* e durante a manifestação dos sintomas da doença as mamadeiras tiveram os bicos alongados e as rações trituradas para facilitar a alimentação dos mesmos. Todos os procedimentos estão de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório tendo sido autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG (Protocolo N° 041/2013).

#### 4.7.2. Indução da EAE

Foram utilizados 12 animais, destes 4 foram utilizados como controle negativo para determinação de citocinas normais, e nos demais induziu-se a EAE.

Os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.) em ambos os lados da base da cauda com 100 µL da emulsão antigênica contendo: 100 µg do peptídeo MOG<sub>35-55</sub> (gentilmente cedida pela Dra. Maria Aparecida Juliano Titular Departamento de Biofísica Escola Paulista de Medicina) e adjuvante completo de Freud (Sigma) suplementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, EUA). No dia da imunização e após 48 horas, foram injetados intraperitonealmente (i.p.) 300 ng de toxina pertussis (Sigma). Os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento dos sinais clínicos (Tabela 7) sendo sacrificados 22 dias após a inoculação (pico da doença no camundongo C57Bl/6).

Tabela 7: Escore clínico dos C57Bl/6 com EAE.

ESCORE	SINAIS CLÍNICOS
0	SADIO
1	PERDA DE TONUS DA CAUDA
2	PARALISIA PARCIAL PATAS TRASEIRAS
3	PARALISIA SEVERA PATAS TRASEIRAS
4	PARALISIA SEVERA PATAS TRASEIRAS E PARALISIA PARCIAL PATAS DA FRENTE
5	PARALISIA COMPLETA

Fonte: FONTES, 2013.

### 4.7.3. Grupos experimentais

As células obtidas de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos foram utilizadas para a avaliação do efeito imunomodulatório *in vitro* do ácido caurenico e partenolido em diferentes concentrações. Células de camundongos C57Bl/6 sadios foram utilizadas como controle negativo. Para o controle positivo utilizou-se células provenientes de animais doentes sem nenhum tratamento. Todos os grupos foram feitos em quintuplicata.

- Grupo I: controle negativo (células de animais sadios)
- Grupo II: controle positivo (células de animais doentes)
- Grupo III: Células de animais doentes na presença do ácido caurenico na concentração de 25  $\mu$ M.
- Grupo IV: Células de animais doentes na presença do ácido caurenico na concentração de 50  $\mu$ M
- Grupo V: Células de animais doentes na presença do ácido caurenico na concentração de 100  $\mu$ M
- Grupo VI: Células de animais doentes na presença do partenolido na concentração de 1  $\mu$ M.
- Grupo VII: Células de animais doentes na presença do partenolido na concentração de 5  $\mu$ M.
- Grupo VIII: Células de animais doentes na presença do partenolido na concentração de 20  $\mu$ M.

### 4.7.4. Obtenção de células peritoneais e esplenócitos

Após eutanásia com xilasina (30 mg/Kg) e quetamina (160mg/kg) (DAMY, et al., 2010) os animais tiveram a retirada do exudato peritoneal por punção em PBS estéril e retirada do baço por dissecação.

#### 4.7.4.1 Obtenção das células do exudato peritoneal

Posterior à assepsia com etanol 70% (v/v), a pele da região abdominal foi removida para exposição do peritônio. Com auxílio de seringa e pinça cirúrgica

estéreis, a cavidade peritoneal foi exposta e lavada com 5mL de PBS, pH 7,4, estéril. Após o massageamento do abdômen por aproximadamente 30 vezes para o despreendimento das células, os lavados peritoneais dos camundongos foram aspirados e acondicionados em tubos plásticos tipo falcon estéreis e mantidos em banho de gelo até a sua utilização.

Após a coleta, os lavados foram centrifugados a 1200 rpm, 8 min, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células ressuspense em 1 mL de PBS estéril (pH 7,4). A contagem das células presentes no lavado peritoneal foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada com solução de Azul de Trypan (0,1%). O volume da suspensão foi então ajustado para  $2 \times 10^6$  células/mL em RPMI completo e colocou-se em cultura por 48 horas, com ou sem estímulo, para a determinação de NO.

#### **4.7.4.2 Obtenção dos esplenócitos**

O baço dos animais foi coletado de forma asséptica e, após lavagem com solução de RPMI estéril, foi macerado em 5 mL desta mesma solução. Estas células foram centrifugadas (1200 rpm, 8 min, 4°C) e o botão celular ressuspense em solução de cloreto de amônio para lise das hemácias. Este processo foi repetido até completa lise das hemácias. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo (10% SFB – soro bovino fetal) e incubadas em placas de 6 poços por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> transferido para tubos do tipo falcons de 15 mL para serem contados em câmara de Neubauer com azul de Tripan, avaliando-se a viabilidade das células. Ajustou-se as células para  $2 \times 10^6$  células/mL e estas foram colocadas em cultura por 24 horas com ou sem estímulo, para a determinação das citocinas. As culturas foram estimuladas com MOG<sub>35-55</sub> na concentração de 10 µg/mL e LPS (Sigma) a 1 µg/mL.

#### **4.7.5. Produção de óxido nítrico (Nitrito)**

Após 48 horas, 100 µL de sobrenadante da cultura de células peritoneais de cada grupo foram colocados nos poços de microplacas com fundo chato tipo Corning. O sobrenadante foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente com 100 µL do Reativo de Griess (DING et al., 1988). Este reativo foi obtido misturando-

se a solução A (50ml de sulfanilamida 1%) com a solução B (50ml de 0,1% dihidroclorato de naftiletenodiamina diluído em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>- Sigma Co., St. Louis), volume a volume. A absorbância foi medida, utilizando-se um filtro de 540 nm em um leitor automático de microplacas (SPECTRAMAX 250, Molecular Devices) e a produção de NO quantificada através de comparação com uma curva padrão de nitrito em concentrações variando de 3,12 a 100 µM, sendo os resultados expressos em moles/mL.

#### **4.7.6. Determinação de citocinas por ELISA**

As células foram cultivadas na densidade de  $2 \times 10^5$ /poço em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (RPMI 5%, Sigma), em câmara úmida, a 37° C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram estimuladas com MOG<sub>35-55</sub> na concentração de 10 µg/ml, LPS (Sigma) a 1 µg/ml. Sobrenadantes foram coletados após 24 horas e as microplacas foram sensibilizadas com um primeiro anticorpo (anti-TNF-α, anti-IFN-γ, anti-IL-17 e anti-IL-6) (PeProtech Inc, New Jersey), diluídos em PBS, incubadas durante 16 horas a 4°C e bloqueadas com PBS-Tween 20 (PBS-T) + 10% SFB, por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e, em seguida, adicionados os padrões (das citocinas citadas anteriormente) recombinante de camundongo (PeProtech Inc, New Jersey) e as amostras dos animais utilizados no modelo experimental. As placas foram então incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e o segundo anticorpo biotinizados (dos respectivos anticorpos primários) (PeProtech Inc, New Jersey) foram adicionados e incubados por mais 1 hora à temperatura ambiente. A seguir mais quatro lavagens com PBS-T foram feitas, adicionado o conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/400 (SIGMA - Co, St. Louis), seguido de incubação por mais 1 hora. Após este período, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo Tampão Citrato (pH 5,5), cromógeno OPD (1mg/mL) e água oxigenada 30% (1µg/mL). A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N e a leitura foi feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 250, *Molecular Devices*) a 440 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrões

recombinantes (as concentrações dos anticorpos e recombinantes foram de acordo com recomendações do fabricante PeProtech Inc, New Jersey).

#### **4.8. VIABILIDADE CELULAR**

O teste de viabilidade celular foi realizado com células peritoneais, obtidas conforme descrito no item **4.7.4.1**. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para  $5 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI 1640 para a realização dos testes propostos. A suspensão de células foi transferida para cada poço da placa de cultura celular com 24 poços e cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de SFB por 24 horas a 37 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub>.

Após incubação por 24 horas, as células foram colocadas em contato com as substâncias: partenolido (1; 5; 10 e 20 µM) (KU, LIN, 2013) e ácido caurenico (25; 50; 100 e 200 µM) (CHOI et al., 2011), cada uma em triplicata. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub>. Após este período, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se, em cada poço, 250 µL da solução de MTT (5 mg/mL), mantendo a placa protegida da luminosidade. A placa foi homogeneizada e novamente mantida em estufa com 5% CO<sub>2</sub> à 37°C, por 4 horas. Em seguida, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados por poço. A placa foi agitada a 150 rpm/10 minutos e a leitura realizada em leitora de microplacas no comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle. O método utilizado foi adaptado de Mosmann (1983).

#### **4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e análise estatística realizada pelo programa Graphpad Prism e o teste de Turkey utilizado, sendo considerado  $p < 0,05$  para indicar uma estatística significativamente diferente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS

Conforme descrito anteriormente, o processo de maceração forneceu o extrato bruto clorofórmico dos rizomas de *S. sonchifolius*, o qual foi submetido a processos cromatográficos, resultando no isolamento da substância Ss<sub>(2-4)</sub>-5, identificada através das técnicas espectroscópicas como ácido caurenico.

Em virtude dos diversos trabalhos de prospecção fitoquímica, muito se conhece sobre a constituição química das diferentes partes de *S. sonchifolius*. Caules e folhas são ricos em proteínas e compostos fenólicos, como ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido ferúlico e flavonoides como a quercetina. Muitos estudos fitoquímicos também têm evidenciado diversas lactonas sesquiterpênicas, sendo a enidrina a principal lactona isolada das folhas de *S. sonchifolius* (BARCELLONA et al., 2012). Além das lactonas sesquiterpênicas, os diterpenos do tipo caurano são metabólitos característicos do gênero *Smallanthus*, destes o ácido caurenico é o principal terpeno reportado nas folhas e, principalmente, nas raízes tuberosas de *S. sonchifolius*.

No estudo conduzido por Araújo e colaboradores (2010) produziu-se, a partir do processo de maceração, o extrato diclorometânico das raízes tuberosas de *S. sonchifolius*, o qual foi submetido ao fracionamento em cromatografia em coluna, utilizando como eluente hexano:acetato de etila (12:1 v/v), como resultado obteve-se majoritariamente o ácido caurenico. Ainda neste estudo, quantificou-se os metabólitos presentes neste extrato através da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), sendo o mesmo constituído por 0,74% de ácido caurenico.

Em relação a *T. parthenium*, o processo de maceração rendeu o extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas dessa planta. Este por sua vez, foi filtrado em carvão ativado, objetivando a remoção parcial de clorofila. E por fim, a solução remanescente deste procedimento foi submetida a processos cromatográficos, resultando no isolamento da substância TpF<sub>(4-5)</sub>-15, identificada através das técnicas espectroscópicas como partenolido.

Como descrito anteriormente, muitos estudos têm evidenciado a presença de partenolido em *T. parthenium*, principalmente, em flores e folhas, enquanto que os

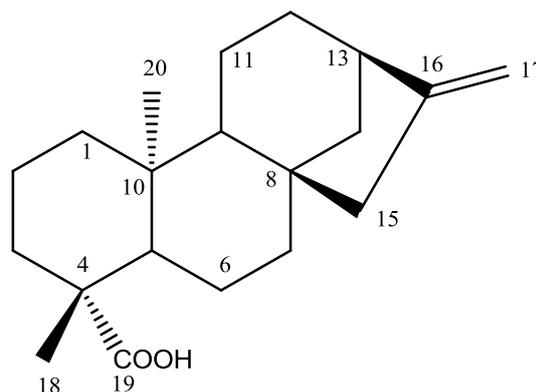
caules e raízes contêm somente traços (HEPTINSTALL et al., 1992; MAJDI et al., 2011). Dessa forma, muitos pesquisadores têm realizado o isolamento dessa lactona sesquiterpênica à partir das partes aéreas de *T. parthenium* (TIUMAN et al., 2005; MAJDI et al., 2011).

Em trabalhos realizados anteriormente, produziu-se, através de maceração em etanol:água (9:1 v/v), o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *T. parthenium*, o qual foi concentrado e, em seguida submetido a processos cromatográficos utilizando como eluente hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. A fração diclorometânica foi re-cromatografada utilizando hexano como fase móvel, rendendo o partenolido puro (TIUMAN et al., 2005).

## 5.2. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

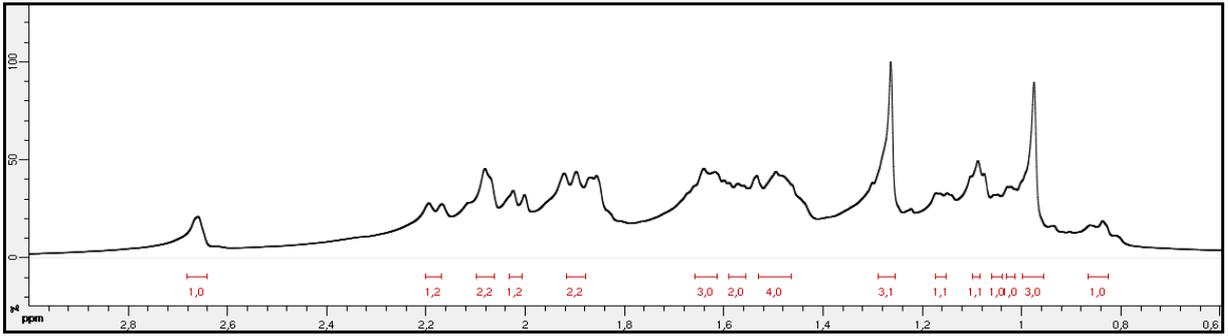
### 5.2.1. Substância Ss<sub>(2-4)</sub>-5

A comparação dos dados espectroscópicos obtidos da substância Ss<sub>(2-4)</sub>-5 juntamente com os dados oriundos da literatura (OKOYE et al., 2013), permitiram concluir que a substância Ss<sub>(2-4)</sub>-5 trata-se de um diterpeno do tipo caurano, denominado ácido caurenoico, representado a seguir (Figura 18).



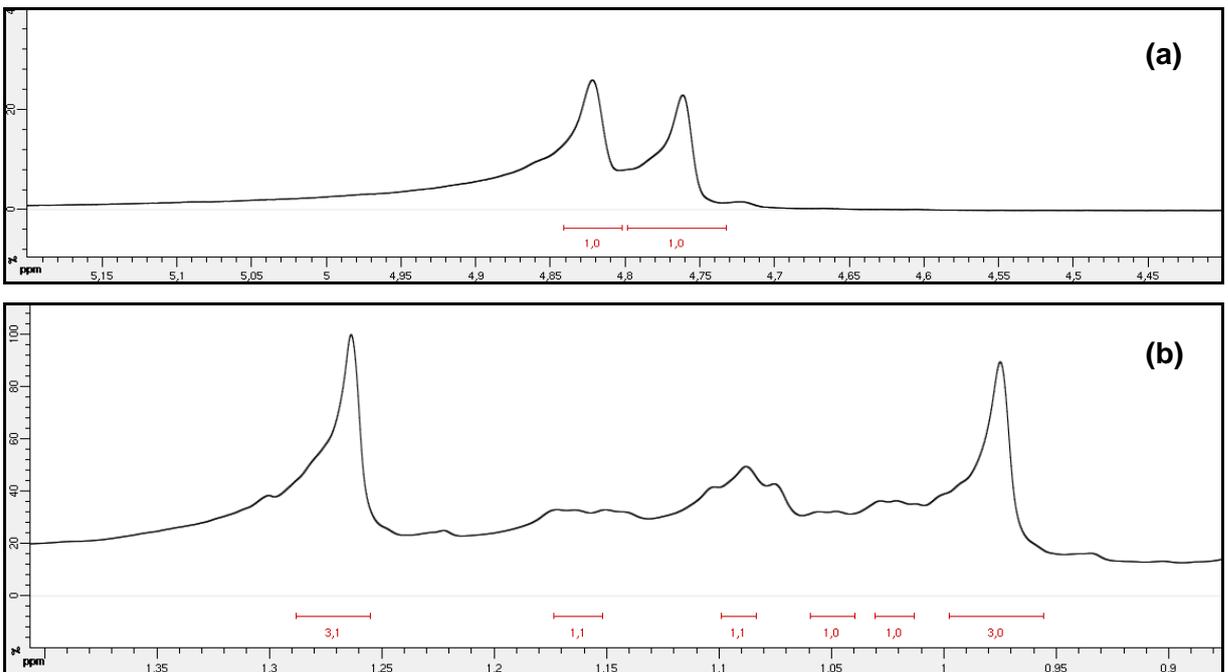
**Figura 18.** Estrutura química do ácido caurenoico isolado das raízes tuberosas de *S. sonchifolius*.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Tabela 8; Figura 21) mostrou deslocamentos químicos (δ) na região compreendida entre 0,83 e 2,66 ppm, relativo aos hidrogênios metilênicos e metílicos de ciclo-alcanos, de difícil resolução em virtude da sobreposição dos sinais (Figura 19).



**Figura 19.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{Ss}_{(2-4)}-5$  no deslocamento químico de 0,6 a 3,0 ppm, presença dos sinais de ciclo-alcenos.

Em continuidade, ressalta-se a presença de dois simpletos em  $\delta$  4,76 e em 4,82 ppm integrados para 1 hidrogênio cada, referentes aos hidrogênios olefínicos H17 (Figura 20a). E ainda observa-se a presença de dois simpletos: um em  $\delta$  1,26 ppm e o outro em 0,97 ppm, integrados para 3 hidrogênios cada, correspondentes aos hidrogênios metílicos H-18 e H-20, respectivamente (Figura 20b) (OKOYE et al., 2013).



**Figura 20.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{Ss}_{(2-4)}-5$  no deslocamento de 4,40 a 5,20 ppm, sinais de hidrogênios olefínicos ( $\delta$  4,76 e 4,82 ppm) (a), e no deslocamento de 0,90 a 1,40 ppm, sinais dos hidrogênios metílicos ( $\delta$  1,26 ppm e 0,97 ppm) (b).

Em relação ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 9; Figura 22), este nos revela que o referido composto é constituído por 20 átomos de carbono, apresentando grupos metilas ( $\text{CH}_3$ ), metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), metínico ( $\text{CH}$ ) e carbono quaternário ( $\text{C}$ ).

Além disso, observam-se dois sinais, um em  $\delta$  155,8 e outro em  $\delta$  103,0 que ao serem comparados com os dados da literatura (OKOYE et al., 2013) mostram-se compatíveis com os carbonos olefínicos C16 e C17, respectivamente. Já o carbono carbonílico pode ser observado em  $\delta$  185,0 ppm. O restante dos carbonos aparecem na região de 15,6 e 57,1 ppm, os quais correspondem aos carbonos C1 ao C15, C18 e C20.

**Tabela 8.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) de  $\text{Ss}_{(2-4)}-5$  e dados do ácido caurenico descritos na literatura.

	<b>Observado</b>	<b>OKOYE et al., 2013.</b> <b><math>\text{CDCl}_3</math>, 500MHz</b>
<b>Posição</b>	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
<b>1 - 15</b>	0,83 - 2,66	0,82 – 2,61
<b>17</b>	4,76 e 4,82 s (1H)	4,72 e 4,78 s (1H)
<b>18</b>	1,26 s (3H)	1,22 s (3H)
<b>20</b>	0,97 s (3H)	0,93 s (3H)

**Tabela 9.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz) de  $\text{Ss}_{(2-4)}-5$  e dados do ácido caurenico descritos na literatura.

	<b>Observado</b>	<b>OKOYE et al., 2013.</b> <b><math>\text{CDCl}_3</math>, 125MHz</b>
<b>Posição</b>	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
<b>1</b>	41,4	41,4
<b>2</b>	19,2	19,2
<b>3</b>	37,9	37,9
<b>4</b>	43,9	43,9
<b>5</b>	57,3	57,2
<b>6</b>	22,0	22,0
<b>7</b>	40,8	40,9
<b>8</b>	44,0	44,0
<b>9</b>	55,2	55,2
<b>10</b>	39,8	39,8
<b>11</b>	18,6	18,6
<b>12</b>	33,2	33,9
<b>13</b>	43,9	43,9
<b>14</b>	39,8	39,9
<b>15</b>	49,0	48,4
<b>16</b>	155,9	156,1
<b>17</b>	103,2	103,2
<b>18</b>	29,1	29,1
<b>19</b>	185,1	184,9
<b>20</b>	15,7	15,7

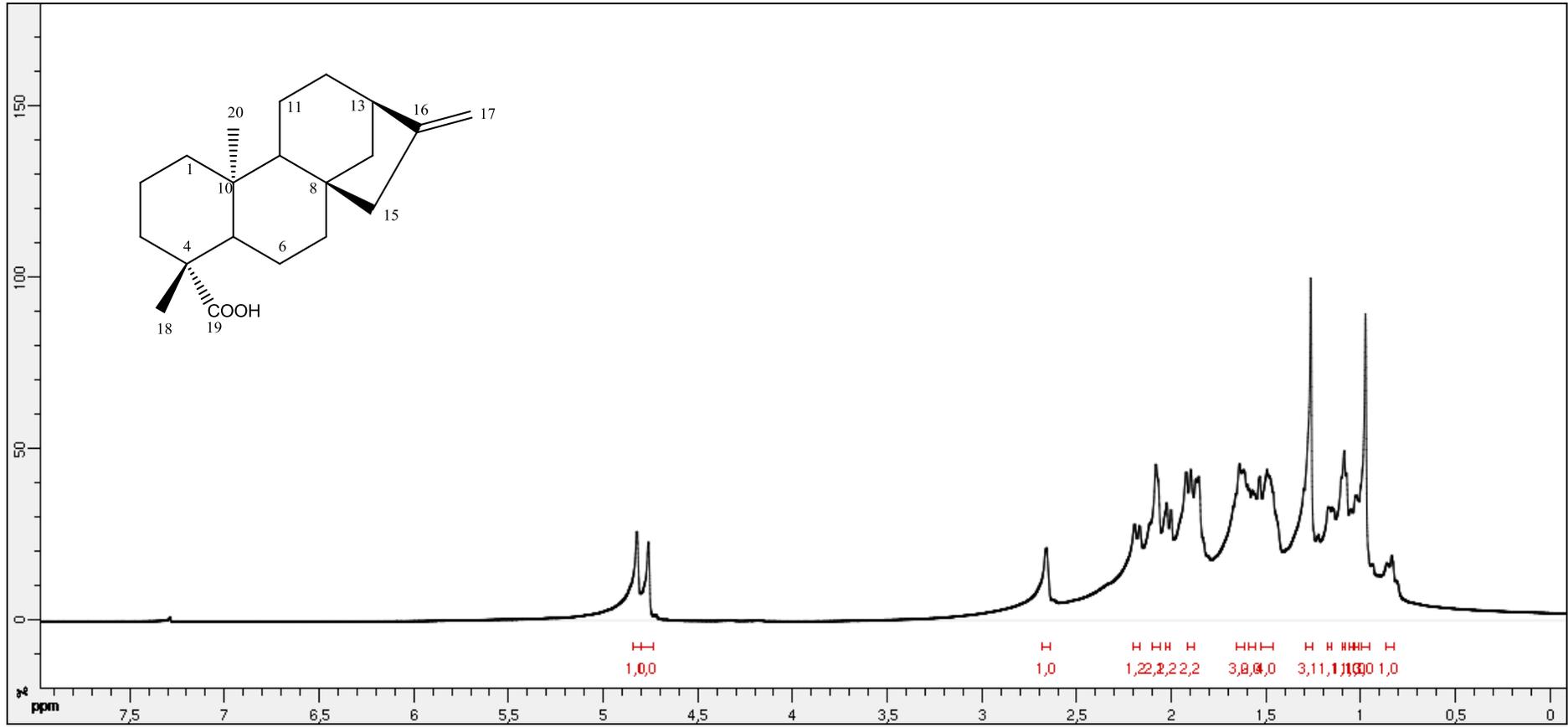
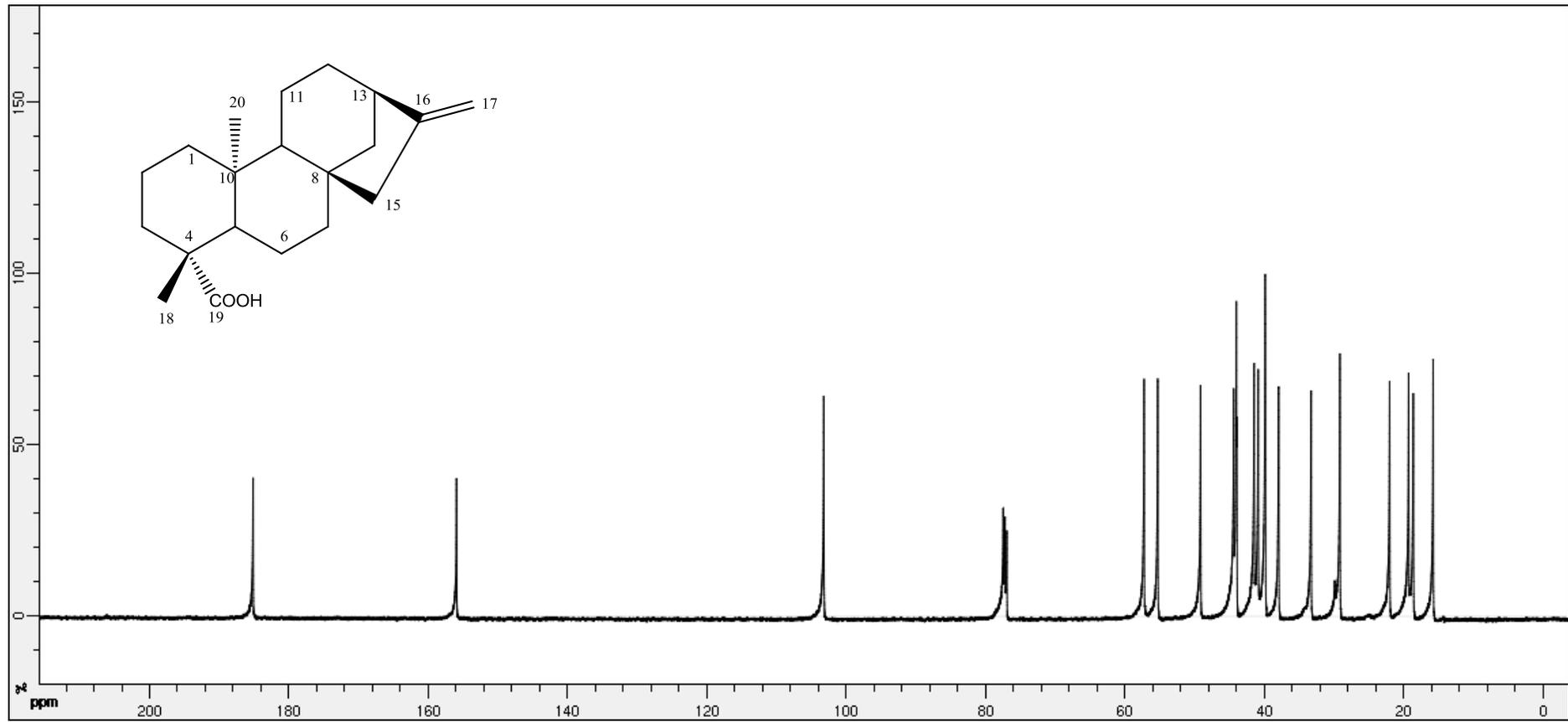


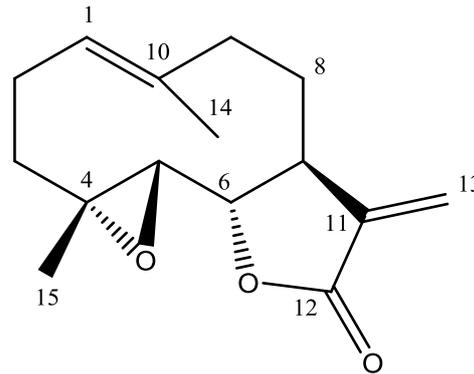
Figura 21. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) de Ss<sub>(2.4)</sub>-5 identificada como ácido caurenoico.



**Figura 22.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz) de  $\text{Ss}_{(2-4)}\text{-5}$  identificada como ácido caurenico.

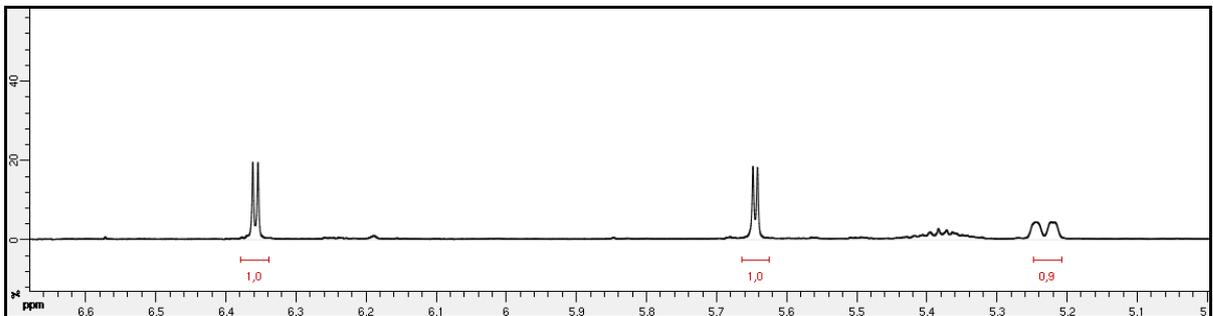
### 5.2.2. Substância TpF<sub>(4-5)</sub>-15

A comparação dos dados espectroscópicos obtidos da substância TpF<sub>(4-5)</sub>-15 com os dados oriundos da literatura (TIUMAN et al., 2005), permitem concluir que a substância TpF<sub>(4-5)</sub>-15 trata-se de uma lactona sesquiterpênica, conhecida como partenolido, representado a seguir (Figura 23).



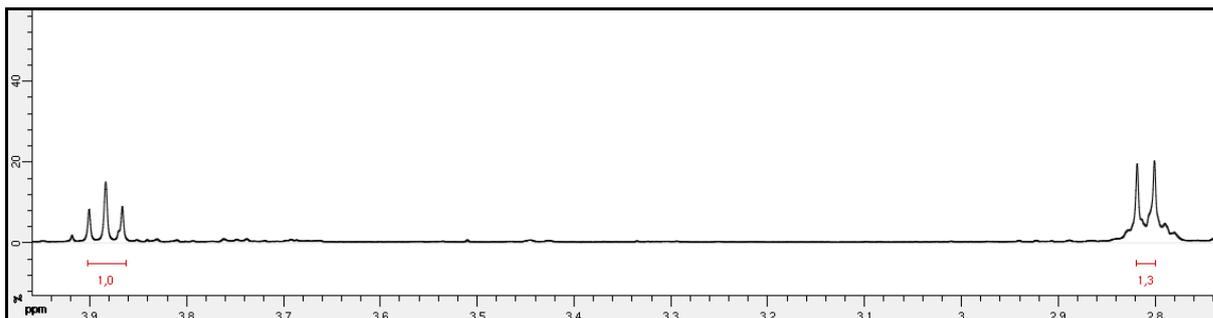
**Figura 23.** Estrutura química do partenolido isolado das partes aéreas de *T.parthenium*.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Tabela 10; Figura 27) são observados sinais em 5,23; 5,64 e 6,34 ppm, correspondentes aos hidrogênios vinílicos (H-1 e H-13), os quais são típicos de lactonas sesquiterpênicas (Figura 24) (PAVIA ET AL., 2010).

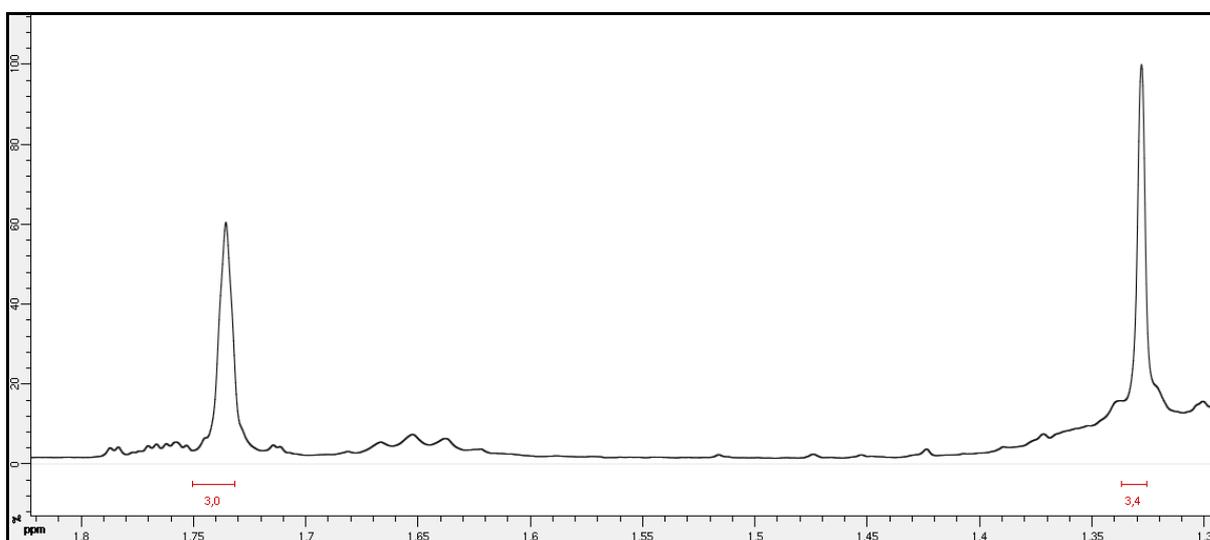


**Figura 24.** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de TpF<sub>(4-5)</sub>-15 no deslocamento de 5,0 a 6,7 ppm, presença dos sinais dos hidrogênios vinílicos.

Os sinais dos hidrogênios oximetínicos (H5 e H6) são observados em  $\delta$  2,80 ppm como um duplete e em  $\delta$  3,88 ppm, como um triplete, integrados para um hidrogênio cada (Figura 25). E ainda ressalta-se a presença de dois simpletos, em  $\delta$  1,74 e 1,33 ppm, integrados para 3 hidrogênios cada, correspondentes aos grupos metilas H-14 e H-15, respectivamente (Figura 26).



**Figura 25.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{TpF}_{(4-5)}-15$  no deslocamento de 2,7 a 4,0 ppm, presença dos sinais dos hidrogênios oximetínicos ( $\delta$  2,80 e 3,88 ppm).



**Figura 26.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{TpF}_{(4-5)}-15$  no deslocamento de 1,3 a 1,8 ppm, presença dos sinais dos hidrogênios metílicos ( $\delta$  1,74 e 1,33 ppm).

Em relação ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 11; Figura 28), podemos concluir que a substância  $\text{TpF}_{(4-5)}-15$  apresenta 15 átomos de carbono, sendo 4 carbonos quaternários, 4 carbonos metínicos, 5 carbonos metilênicos e 2 carbonos metílicos.

Os sinais em  $\delta$  125,3; 134,6; 139,2 e 121,2 ppm foram atribuídos aos carbonos olefínicos C11 e C13, C1 e C10, respectivamente. E o carbono carbonílico pode ser observado em  $\delta$  169,2 ppm. Além disso, observam-se sinais em  $\delta$  61,5 e 66,4 ppm, que ao serem comparados com os dados da literatura (TIUMAN et al., 2005) mostram-se compatíveis com os carbonos do grupamento epóxido C-4 e C-5, respectivamente.

**Tabela 10.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) de  $\text{TpF}_{(4-5)}-15$  e dados do partenolido descritos na literatura.

Posição	Observado	TIUMAN et al., 2005.
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\text{CDCl}_3$ , 500MHz $\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	5,23 d (1H), $J=12,0\text{Hz}$	5,21 dd (1H), $J=2,7$ ; 12,0 Hz
2, 3, 7, 8, 9	1,27; 2,19; 2,38 m (9H)	1,20 - 1,28 m (1H) 1,70 - 1,77 m (1H) 2,11 - 2,21 m (4H) 2,32 - 2,49 m (2H) 2,74 - 2,82 m (1H)
5	2,80 d (1H), $J=8,8\text{Hz}$	2,79 d (1H), $J=9,0\text{ Hz}$
6	3,88 t (1H), $J=8,4\text{ Hz}$	3,86 t (1H), $J=8,4\text{ Hz}$
13	5,64 d (1H), $J=3,0\text{ Hz}$ 6,34 d (1H), $J=3,6\text{ Hz}$	5,62 d (1H) $\text{H}\beta$ , $J=3,0\text{ Hz}$ 6,34 d (1H) $\text{H}\alpha$ , $J=3,6\text{ Hz}$
14	1,74 s (3H)	1,72 s (3H)
15	1,33 s (3H)	1,31 s (3H)

**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz) de  $\text{TpF}_{(4-5)}-15$  e dados do partenolido descritos na literatura.

Posição	Observado	TIUMAN et al., 2005.
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\text{CDCl}_3$ , 125MHz $\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	125,3	125,3
2	24,1	24,1
3	36,3	36,3
4	61,5	61,5
5	66,4	66,4
6	82,4	82,4
7	47,7	47,7
8	30,6	30,6
9	41,2	41,2
10	134,6	134,6
11	139,2	139,2
12	169,2	169,3
13	121,2	121,3
14	16,9	16,9
15	17,3	17,3

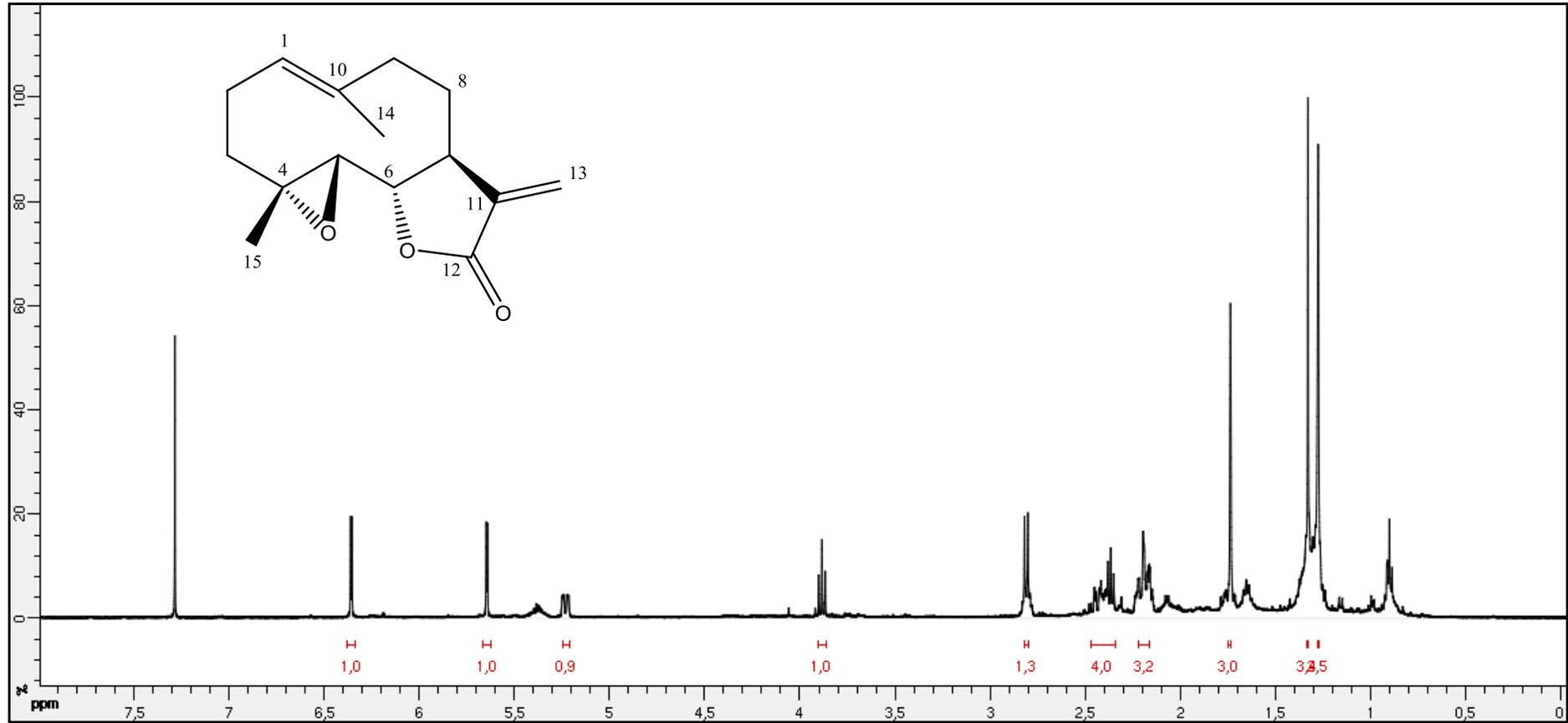


Figura 27. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) de TpF<sub>(4-5)</sub>-15 identificada como partenolide.

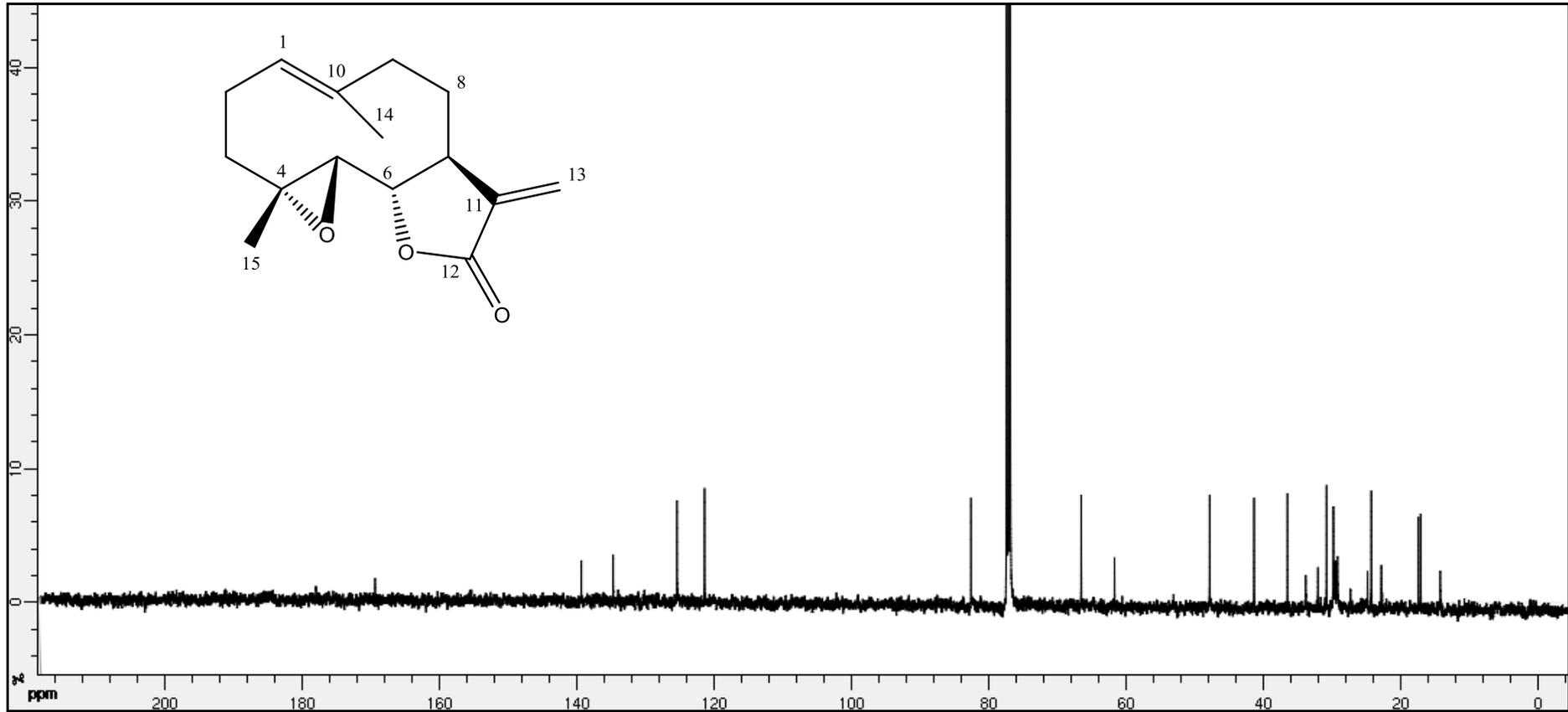
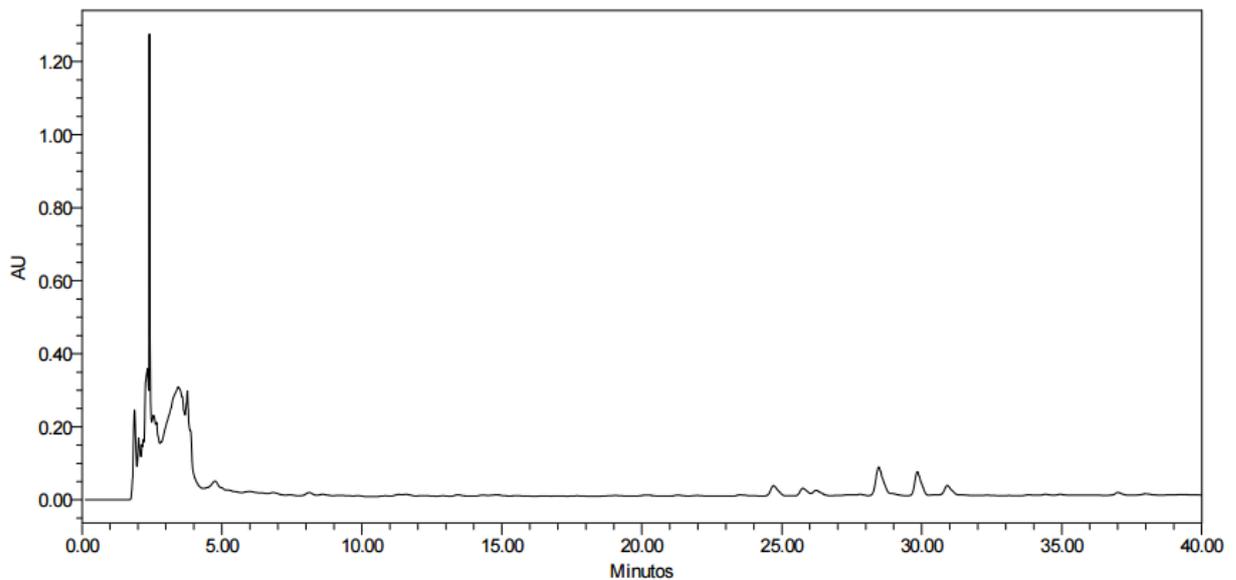


Figura 28. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz) de  $\text{TpF}_{(4-5)}$ -15 identificada como partenolido.

### 5.3. CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIODO (CLAE-DAD)

#### 5.3.1. *Smallanthus sonchifolius* e ácido caurenico

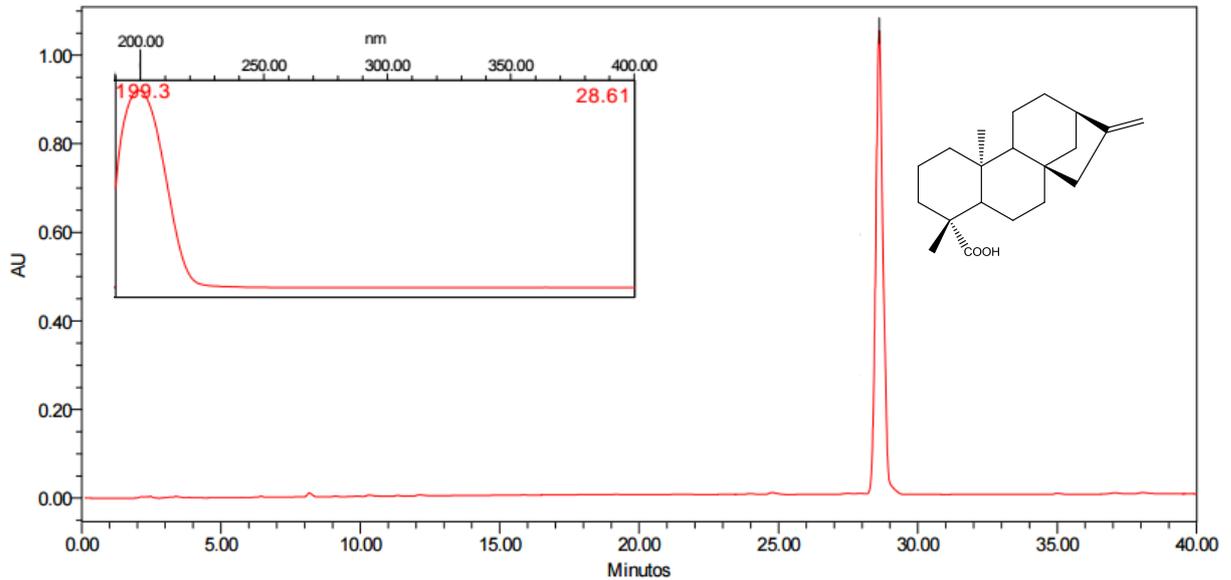
A análise por CLAE-DAD do extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de *Smalanthus sonchifolius* detectou a presença do ácido caurenico e diversas outras substâncias (Figura 29). Diversos estudos investigaram a constituição química das raízes tuberosas de *S. sonchifolius* demonstrando a presença de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido ferúlico, flavonoides e terpenos como o ácido caurenico (LACHMAN et al., 2007; SIMONOVISKA et al., 2003).



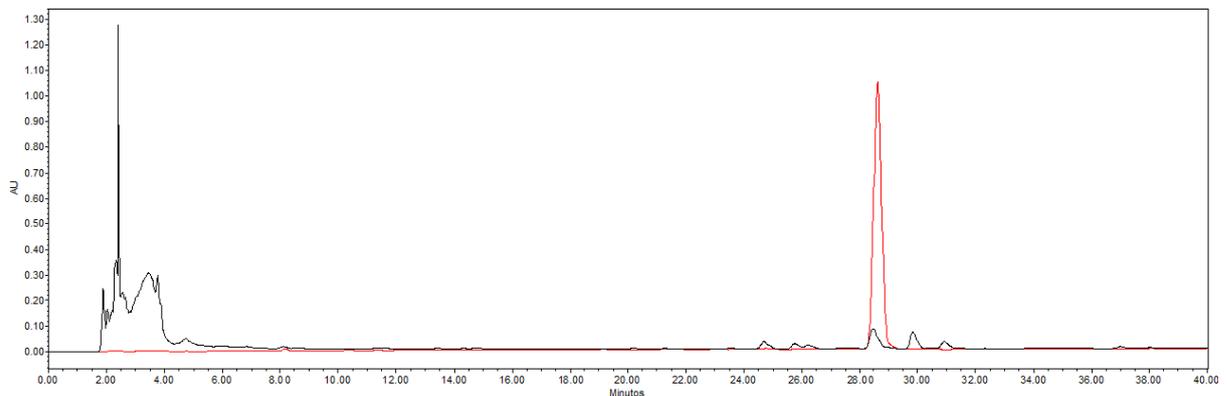
**Figura 29.** Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de *S. sonchifolius*. Injeção de 50  $\mu$ L do Ss em coluna C18; 4,6 x 250 mm; 5  $\mu$ m. Fase móvel:  $H_3PO_4$  0,5% em água (A) e acetonitrila (B), variando de 60 a 100% de B (0 - 30 min), mantendo os 100% até 40 min, fluxo de fase a 1 mL/min,  $\lambda$  = 200 nm.

Em relação ao ácido caurenico, muitos estudos também têm identificado e isolado esse diterpeno das raízes tuberosas de *S. sonchifolius* (LACHMAN et al., 2007; VALENTOVÁ, ULRICHOVÁ, 2003). A análise qualitativa em CLAE-DAD do ácido caurenico (Figura 30) revela o tempo de retenção deste diterpeno de 28,61 min nas condições aplicadas. Dessa forma, baseando-se no tempo de retenção, a sobreposição dos cromatogramas obtidos nas mesmas condições cromatográficas

do ácido caurenóico e do extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de *S. sonchifolius* é possível observar a presença deste diterpeno no extrato do qual foi isolado (Figura 31). Esse diterpeno foi obtido com grau de pureza de 99%.



**Figura 30.** Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do ácido caurenóico utilizando-se  $\lambda = 200$  nm. Injeção de 15  $\mu$ L em coluna C18; 4,6 x 250 mm; 5  $\mu$ m. Fase móvel: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,5% em água (A) e acetonitrila (B), variando de 60 a 100% de B (0 - 30 min), mantendo os 100% até 40 min, fluxo de fase a 1 mL/min,  $\lambda = 200$  nm.

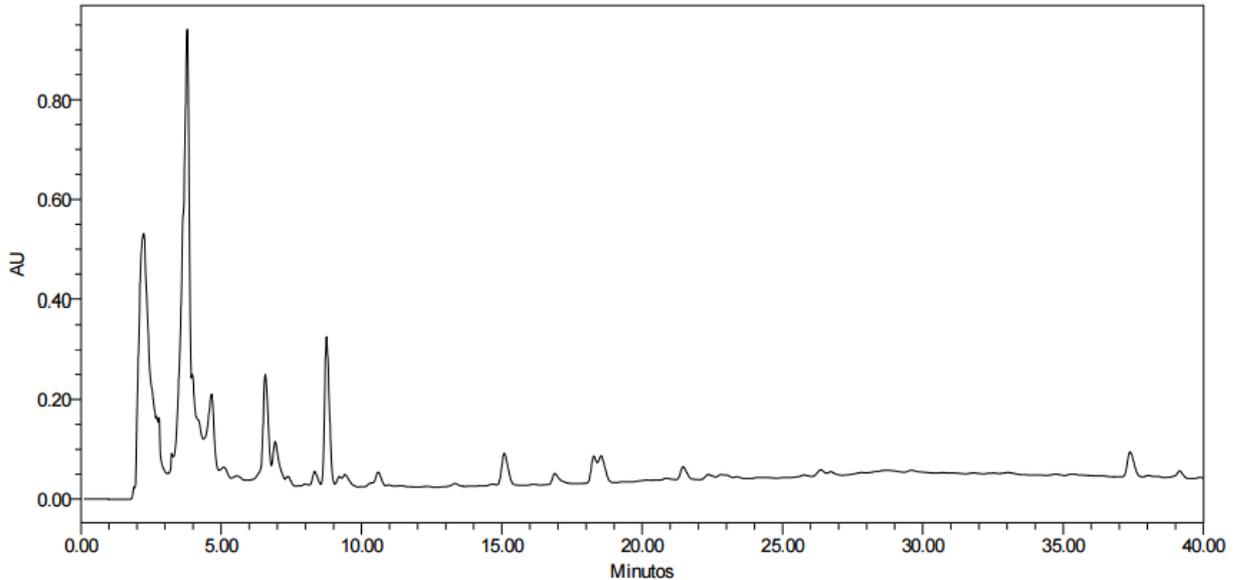


**Figura 31.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto clorofórmico das raízes tuberosas de *S. sonchifolius* e do ácido caurenóico. O pico em 28,61 min representa o ácido caurenóico.

### 5.3.2. *Tanacetum parthenium* e partenólido

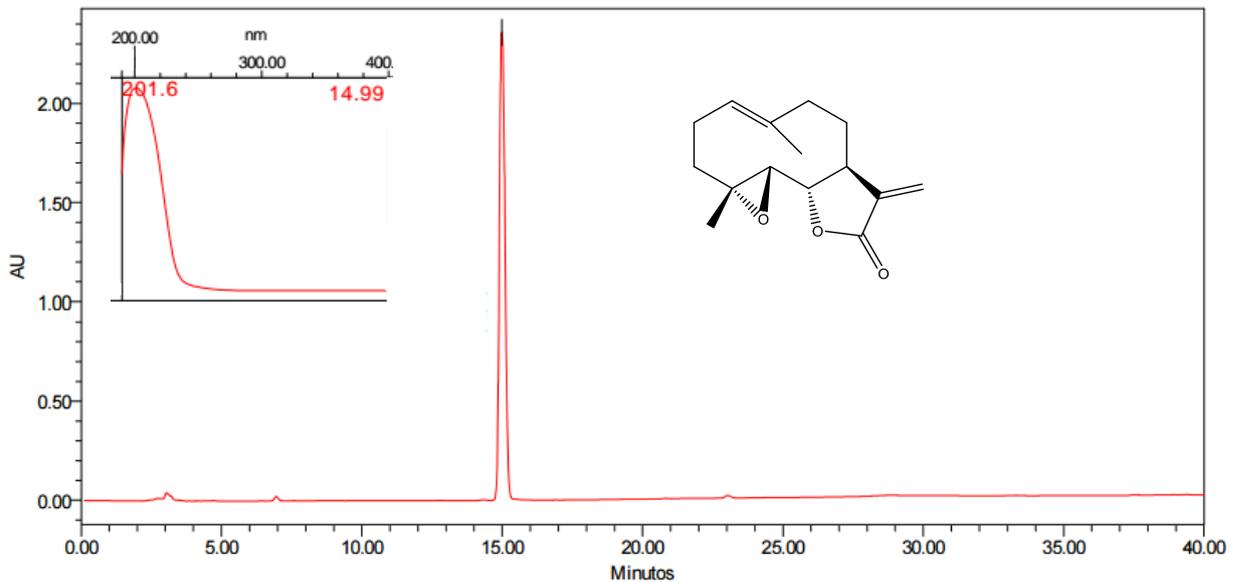
Na análise qualitativa por CLAE-DAD do extrato bruto hidroalcoólico filtrado das partes aéreas de *Tanacetum parthenium* (Figura 32) pode-se observar a

presença de diversas substâncias, as quais também não podem ter a classe química inferida apenas com o espectro de UV. Porém, estudos anteriores revelam que as partes aéreas de *T. parthenium* é constituída por óleos voláteis, esteróis, flavonoides, taninos e lactonas sesquiterpênicas (KAPLAN et al., 2002).

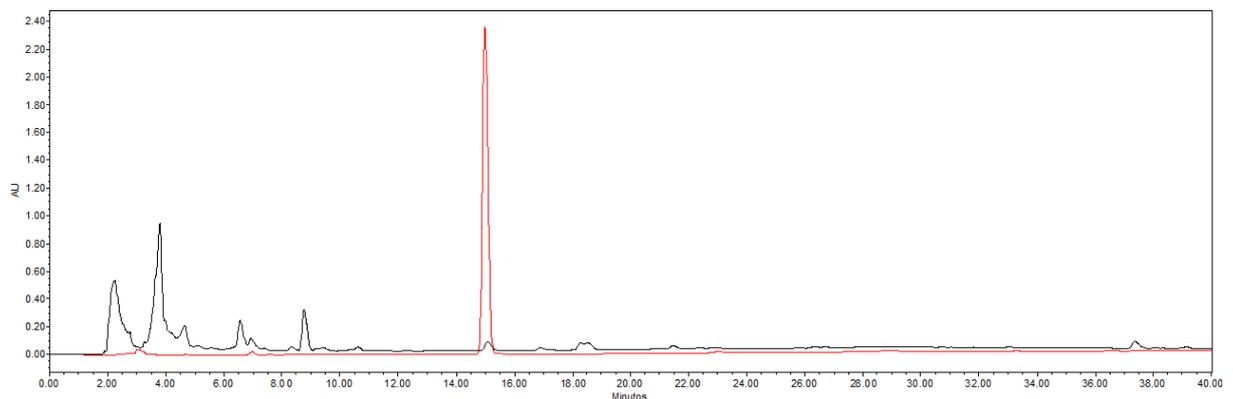


**Figura 32.** Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto hidroalcoólico filtrado das partes aéreas de *T. parthenium*. . Injeção de 50  $\mu$ L do TpF em coluna C18; 4,6 x 250 mm; 5  $\mu$ m. Fase móvel:  $H_3PO_4$  0,5% em água (A) e acetonitrila (B), variando de 40 a 100% de B (0 - 30 min), fluxo de fase a 1 mL/min,  $\lambda$  = 200 nm.

Segundo Majdi e colaboradores (2011), o partenolido é o principal composto de *T. parthenium* dentre as lactonas sesquiterpênicas. À partir da análise em CLAE-DAD observa-se o partenolido, nas condições aplicadas, no tempo de retenção 14,99 min (Figura 33). Assim, a sobreposição dos cromatogramas obtidos nas mesmas condições cromatográficas nos permitem observar a presença do partenolido no extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *T. parthenium* (Figura 34). O partenolido foi obtido com 97% de pureza.



**Figura 33.** Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do partenolido utilizando-se  $\lambda = 200$  nm. Injeção de 15  $\mu$ L em coluna C18; 4,6 x 250 mm; 5  $\mu$ m. Fase móvel: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,5% em água (A) e acetonitrila (B), variando de 40 a 100% de B (0 - 30 min), fluxo de fase a 1 mL/min, fluxo de fase b 1 mL/min,  $\lambda = 200$  nm.



**Figura 34.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto hidroalcoólico filtrado das partes aéreas de *T. parthenium* e do partenolido. O pico em 14,99 min representa o partenolido.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR *in vitro* DO ÁCIDO CAURENOICO E PARTENOLIDO SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

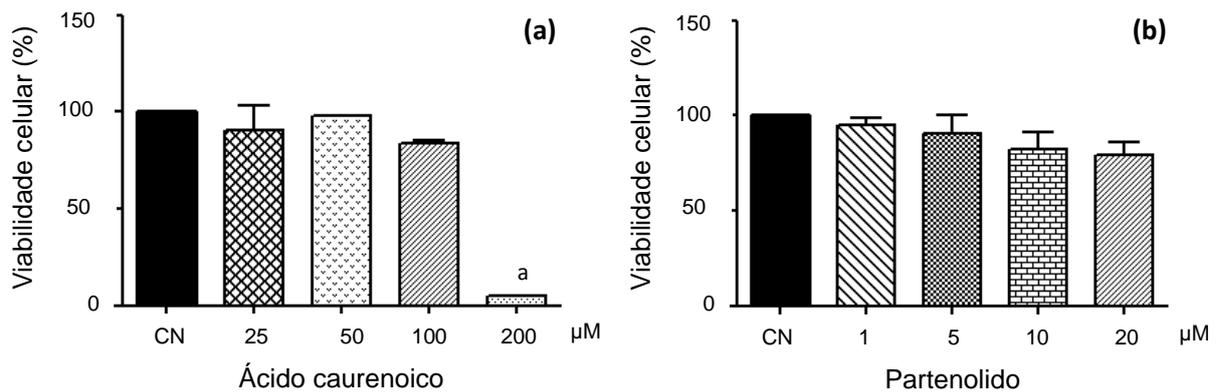
O experimento com MTT foi primeiramente proposto por Mosmann (1983) para avaliação da sobrevivência e proliferação de células de mamíferos, uma vez que a coloração, obtida através da formação de cristais de formazan só é possível através das mitocôndrias de células vivas e viáveis. Dessa forma, no presente trabalho, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT (3-

[4,5-brometo-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio, o qual é convertido em sal de formazan pelas células vivas, formando uma coloração azulada.

Nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , o ácido caurenico apresentou 90, 97 e 83% de viabilidade celular. Porém, na maior concentração avaliada de ácido caurenico, 200  $\mu\text{M}$ , observou-se uma baixa viabilidade celular (média de 5,88%) (Figura 35a). Corroborando com os nossos resultados, estudos anteriores demonstram que o ácido caurenico não apresenta toxicidade em diversos tipos celulares em diferentes concentrações. No trabalho de Lyu e colaboradores (2011) o ácido caurenico foi testado sobre células HEK 293, já Choi e colaboradores (2011) testaram esse diterpeno sobre macrófagos RAW 264,7. Em ambos estudos, assim como no presente trabalho, não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo do ácido caurenico até a concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

Além do ácido caurenico, o partenolido também foi avaliado em relação à toxicidade sobre macrófagos peritoneais. Neste caso, nenhum efeito citotóxico significativo foi observado em quaisquer das concentrações avaliadas (Figura 35b). Semelhante aos nossos resultados, Kim e colaboradores (2013) demonstraram a baixa citotoxicidade do partenolido até a concentração de 20  $\mu\text{M}$  sobre a linhagem celular de câncer colorretal humano, SW620. Neste tipo celular o partenolido apresentou citotoxicidade à partir de 30  $\mu\text{M}$ . No trabalho de Walshe-Roussel e colaboradores (2013) observou-se efeitos citotóxicos somente na concentração de 40  $\mu\text{M}$  de partenolido sobre monócitos THP-1.

Dessa forma, estas substâncias puderam ser avaliadas seguramente sobre a determinação de mediadores químicos em células oriundas de camundongos C57Bl/6-EAE induzidos sem causar danos a tais células nas concentrações não citotóxicas.



**Figura 35.** Viabilidade celular de macrófagos peritoneais em contato com ácido caurenóico **(a)** e partenólido **(b)** em diferentes concentrações. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5®, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM).

a  $p < 0,001$  CN

## 5.5. INDUÇÃO DA EAE

No experimento realizado, nenhum animal do grupo controle negativo apresentou qualquer sinal clínico neurológico da EAE. Já no grupo de camundongos induzidos com a EAE observou-se, a partir do 10º dia da indução da EAE, manifestações dos sintomas da doença. Inicialmente esses animais apresentaram perda do tônus da cauda (score 1), seguidos da paralisia parcial dos membros posteriores (score 2).

Semelhantemente aos nossos resultados, no estudo conduzido por Fontes e colaboradores (2014), no qual utilizou-se o mesmo modelo experimental, observou-se que nenhum animal do grupo controle negativo apresentou qualquer sinal clínico de deficiência neurológica. Já nos grupos com indução da EAE pode-se observar sinais que progrediam de forma ascendente, no qual os animais apresentavam perda do tônus da cauda, paralisia parcial dos membros posteriores, paralisia severa dos membros posteriores, tetraplegia.

Em torno do 21º dia de indução da EAE alguns animais apresentaram melhoras clínicas espontâneas, dessa forma os animais foram sacrificados no 22º dia a fim de dosar os mediadores químicos.

## 5.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO CAURENOICO E PARTENOLIDO SOBRE OS NÍVEIS DE MEDIADORES EM SOBRENADANTE DE ESPLÊNOCITOS DOS CAMUNDONGOS C57BI/6-EAE INDUZIDOS

### 5.6.1 Produção de óxido nítrico

Após a eutanásia, os animais tiveram a retirada do exudato peritoneal para a realização da determinação de NO. A produção deste mediador revela que os animais pertencentes ao grupo controle negativo apresentaram baixos níveis de NO (13,24  $\mu\text{M}$ ), enquanto no grupo controle positivo essa produção foi superior a 32  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) (Figura 36).

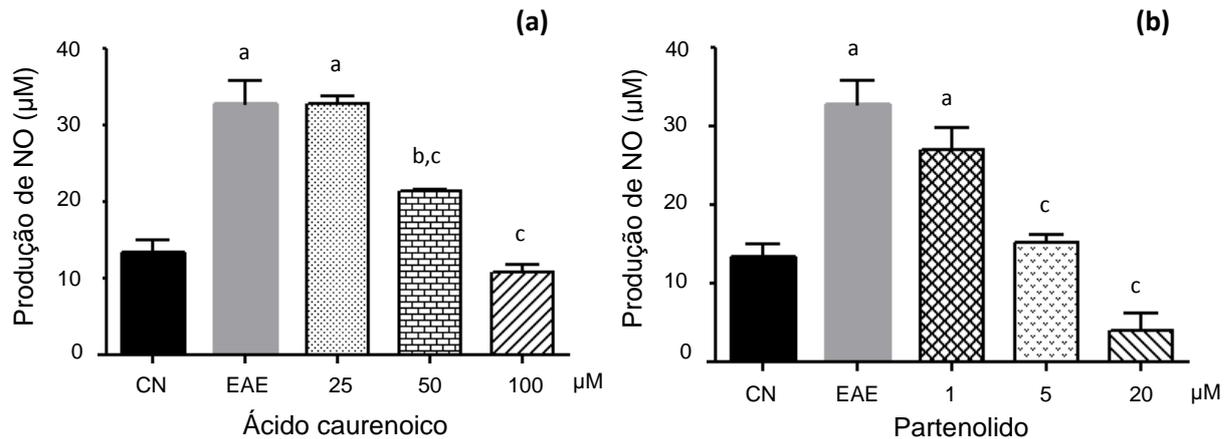
Nos grupos com células tratadas, observa-se um efeito inibitório desempenhado pelas duas substâncias ensaiadas. Com relação ao grupo de células que receberam ácido caurenico, este foi capaz de inibir a produção de NO nas duas maiores concentrações (50 e 100  $\mu\text{M}$ ), apresentando 34 e 67% de inibição, respectivamente (Figura 36a) (Tabela 12), resultados significativamente diferentes do grupo controle positivo ( $p < 0,001$ ). Corroborando com os resultados encontrados, Choi e colaboradores (2011) demonstraram que o ácido caurenico foi capaz de inibir a produção de NO, em macrófagos RAW 264,7 estimulados por LPS, nestas mesmas concentrações.

Já o partenolido apresentou redução da produção de NO na concentração de 1  $\mu\text{M}$  e inibição desta produção nas concentrações de 5 e 20  $\mu\text{M}$ , sendo os valores encontrados de, aproximadamente, 17, 53 e 87% de inibição, respectivamente (Figura 36b) (Tabela 12). Nas duas maiores concentrações de partenolido, os níveis de NO encontrados foram diferente significativamente do grupo controle positivo ( $p < 0,001$ ). Esses resultados evidenciam que o partenolido apresentou uma tendência de resposta concentração dependente. Além disso, observa-se que na maior concentração de partenolido avaliada, a produção de NO foi menor (4  $\mu\text{M}$ ) que a encontrada nos animais saudáveis (13,24  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0,001$ ) (Figura 36b). No trabalho de Fiebich e colaboradores (2002) o partenolido inibiu a produção de NO em concentrações ainda menores, abaixo de 4  $\mu\text{M}$ , em células da microglia estimuladas por LPS.

Como descrito anteriormente, sabe-se que os macrófagos desempenham importante papel na patologia da EM. Estudos mostram que infiltrados inflamatórios, em lesões decorrentes da EM, apresentam grandes quantidades de macrófagos, os quais estão envolvidos em mecanismos que conduzem à desmielinização e lesão axonal. Estes processos são resultantes de uma infinidade de substâncias neurotóxicas que os macrófagos são capazes de secretar, como metaloproteinases

de matriz, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NEWMAN et al., 2001; HEPPNER et al., 2005).

No modelo de EAE, tem sido demonstrado que a diminuição dos infiltrados de macrófagos reduz tanto os sinais clínicos da EM quanto as lesões axonais. Além disso, estudos sugerem ligação direta entre o aumento da atividade de macrófagos e o curso agravado da doença (HEPPNER et al., 2005).



**Figura 36.** Produção de NO em cultura de células peritoneais de camundongos C57BI/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenico (a) ou partenolido (b). Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5®, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM).

- a  $p < 0,001$  CN
- b  $p < 0,01$  CN
- c  $p < 0,001$  EAE

### 5.6.2 Fator de necrose tumoral-alfa

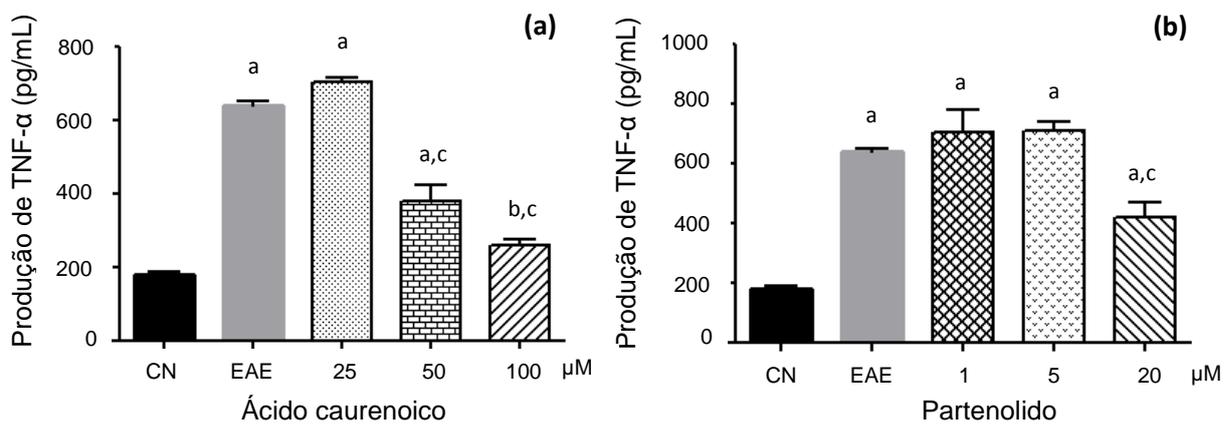
Após a eutanásia, os animais tiveram a retirada do baço para a quantificação de algumas citocinas, dentre elas o TNF- $\alpha$ . Como demonstrado, observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle negativo (178 pg/mL) e o grupo positivo (637 pg/mL) ( $p < 0,001$ ) (Figura 37).

Nos grupos com células tratadas, verificou-se que o ácido caurenico na menor concentração (25 µM) não foi capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$  (701 pg/mL), sendo esta próxima aos níveis encontrados no controle positivo (637 pg/mL), mostrando que a produção máxima de TNF- $\alpha$  está entre 600 e 700pg/mL. Porém, nas duas maiores concentrações (50 e 100 µM) observa-se uma diminuição considerável no nível de TNF- $\alpha$  (380 e 259 pg/mL), comparando-se ao controle

positivo (637 pg/mL) ( $p < 0,001$ ) (Figura 37a), apresentando 40 e 59% de inibição de TNF- $\alpha$ , respectivamente (Tabela 12).

No trabalho de Diaz-Viciedo e colaboradores (2008), o ácido caurenico foi capaz de promover 60% de redução de TNF- $\alpha$  numa concentração de 20  $\mu$ M, em macrófagos RAW 264,7 ativados por LPS. A redução promovida pelo ácido caurenico no presente trabalho foi de 40% na concentração de 50  $\mu$ M (Tabela 12). Portanto, em ambos os estudos observa-se que o ácido caurenico apresentou resultados promissores na interferência da produção de TNF- $\alpha$ .

Considerando o partenolido, a produção de TNF- $\alpha$  foi diferente estatisticamente do controle negativo em todas as concentrações avaliadas ( $p < 0,001$ ) (Figura 37b). Apesar disso, na maior concentração de partenolido (20  $\mu$ M) foi observado 34% de inibição da produção de TNF- $\alpha$  em relação ao controle positivo, ( $p < 0,001$ ) (Tabela 12). Em trabalhos anteriores, o partenolido apresentou inibição da produção de TNF- $\alpha$  em concentrações menores. Por exemplo, no estudo de Magni et al. (2012) e Uchi et al. (2002), o partenolido apresentou atividade a partir de 5  $\mu$ M, apresentando níveis de TNF- $\alpha$  próximos ao do controle negativo, em células de microglia e monócitos derivados de células dentriticas estimuladas por LPS.



**Figura 37.** Produção de TNF- $\alpha$  em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenico **(a)** ou partenolido **(b)**. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5®, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM).

- a  $p < 0,001$  CN
- b  $p < 0,01$  CN
- c  $p < 0,001$  EAE

### 5.6.3 Interferon-gama

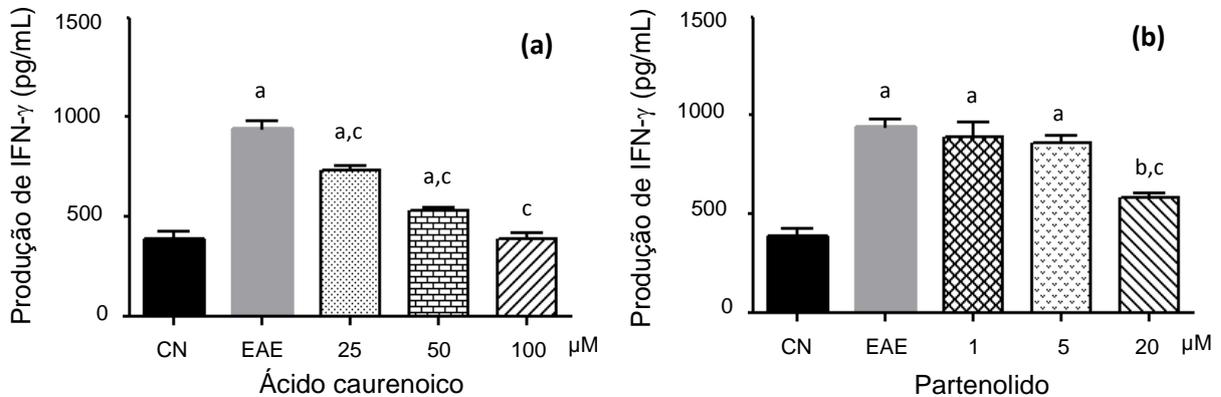
Em relação aos níveis de IFN- $\gamma$ , observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle negativo (384 pg/mL) e o grupo controle positivo (943 pg/mL) ( $p < 0,001$ ) (Figura 38).

Nas células tratadas com ácido caurenico, pode-se observar diminuição gradual da produção de IFN- $\gamma$ , mostrando uma tendência de resposta concentração dependente, além de todas as concentrações testadas apresentarem diferença significativa em relação ao controle positivo ( $p < 0,001$ ). Nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  houve diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,001$ ), já na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , nenhuma diferença estatística foi observada (Figura 38a). Dessa forma, pode-se inferir que o ácido caurenico, nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , diminuiu consideravelmente a produção de IFN- $\gamma$ , sendo que na maior concentração (100  $\mu\text{M}$ ) este foi capaz de inibir a produção desta citocina (389 pg/mL) aproximando-a ao nível basal (384 pg/mL). A redução da produção de IFN- $\gamma$ , pelo ácido caurenico nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , foi de 22, 43 e 58% de inibição, respectivamente ( $p < 0,001$ ) (Tabela 12). Alguns pesquisadores demonstraram que diversos derivados do ácido caurenico inibem a produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos de camundongos BALB/c (HUESO-FALCON et al., 2011).

Semelhantemente ao ácido caurenico, o partenolido também foi capaz de mostrar uma tendência na redução da produção de IFN- $\gamma$  em todas as concentrações testadas. Porém, somente na concentração de 20  $\mu\text{M}$  (585 pg/mL) observou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo (943 pg/mL) ( $p < 0,001$ ). Além disso, o nível de IFN- $\gamma$  encontrado no controle negativo foi de 384 pg/mL, enquanto que no grupo tratado com partenolido (20  $\mu\text{M}$ ) foi de 585 pg/mL ( $p < 0,01$ ) (Figura 38b). Corroborando com esses resultados, Li e colaboradores (2006) demonstraram que o partenolido, na concentração de 48  $\mu\text{M}$ , foi capaz de diminuir a produção de IFN- $\gamma$  em macrófagos RAW 267,4 estimulados por LPS.

Uma vez que o IFN-g está relacionado à ativação de macrófagos, diferenciação e manutenção das células Th1 e ambas as células tem importante papel no processo de desmielinização, sua redução pode levar à atenuação da resposta no SNC. Além disso, o IFN-g é uma das principais citocinas responsáveis pelas alterações provocadas na BHE durante o desenvolvimento da EAE, facilitando

a entrada de diversas células no SNC (FLETCHER et al., 2010; MURTA-FERRARI et al., 2013).



**Figura 38.** Produção de IFN- $\gamma$  em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenico **(a)** ou partenolido **(b)**. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5®, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM).

- a  $p < 0,001$  CN
- b  $p < 0,01$  CN
- c  $p < 0,001$  EAE

#### 5.6.4 Interleucina 6

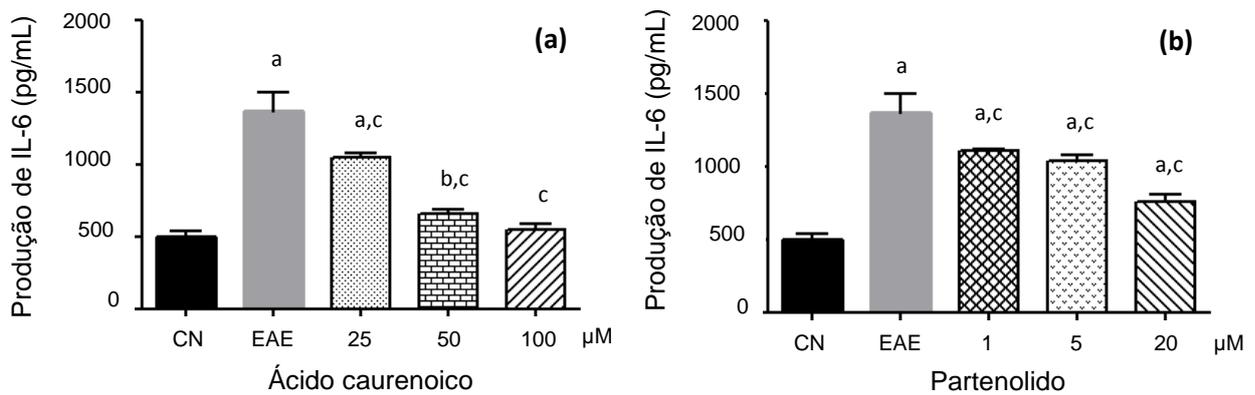
A IL-6 teve seus níveis elevados no grupo EAE (1361 pg/mL) quando comparada ao grupo controle negativo (501 pg/mL) ( $p < 0,001$ ) (Figura 39). O ácido caurenico foi capaz de reduzir essa produção em todas as concentrações avaliadas com diferença significativa em relação ao controle positivo ( $p < 0,001$ ), e com tendência de resposta concentração dependente (Figura 39a).

Quando avaliado a 25  $\mu$ M, o ácido caurenico foi capaz de inibir a produção de IL-6 em 23%. Já nas duas maiores concentrações de ácido caurenico, 50 e 100  $\mu$ M, a inibição da produção de IL-6 foi de 52 e 59%, respectivamente, não apresentando nenhuma diferença significativa do controle negativo (501 pg/mL) (Figura 39a) (Tabela 12).

O partenolido também foi avaliado sobre a produção de IL-6 e assim como o ácido caurenico, foi capaz de reduzir a produção desta citocina nas três concentrações avaliadas, além de apresentarem diferença significativa do controle positivo ( $p < 0,001$ ). Quando avaliado a 1  $\mu$ M, o partenolido reduziu os níveis de IL-6

para 1107 pg/mL, apresentando 18% de inibição. Já em 5 e 20  $\mu\text{M}$ , o partenolido inibiu em 23 e 44% a produção de IL-6, respectivamente (Figura 39b) (Tabela 12).

No estudo conduzido por Magni e colaboradores (2012), o partenolido também diminuiu a produção da IL-6, porém em células de microglia, apresentando 99% de redução numa concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Outros trabalhos, utilizando modelos *in vivo*, mostram que o partenolido é capaz de diminuir a expressão gênica da IL-6 em órgãos como baço e fígado (SMOLINSKI, PESTKA, 2005).



**Figura 39.** Produção de IL-6 em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenoico **(a)** ou partenolido **(b)**. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5®, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM).

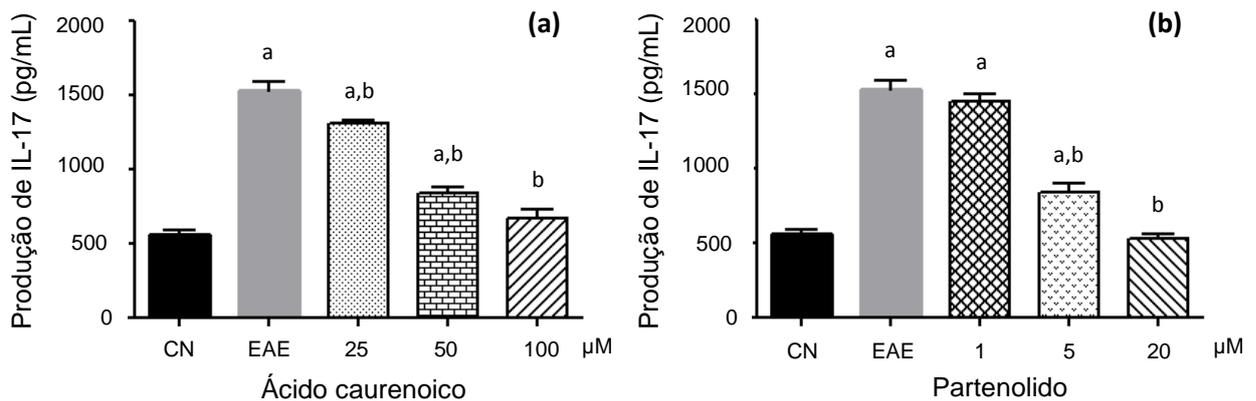
- a  $p < 0,001$  CN
- b  $p < 0,05$  CN
- c  $p < 0,001$  EAE

### 5.6.5 Interleucina 17

Assim como os mediadores já citados, os níveis de IL-17 também se mostraram elevados em células do grupo EAE (1527 pg/mL) quando comparado ao grupo controle negativo (559 pg/mL) ( $p < 0,001$ ) (Figura 40). Os efeitos do ácido caurenoico sobre a redução na produção desta citocina diferiram significativamente em relação ao grupo EAE ( $p < 0,001$ ) (Figura 40a).

Além disso, observa-se diminuição gradual da produção de IL-17 com o aumento da concentração de ácido caurenoico. Na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , os níveis encontrados foram de 1302 pg/mL, enquanto nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , esses níveis foram reduzidos para 837 e 671 pg/mL, respectivamente. Dessa forma, é possível sugerir uma resposta concentração dependente (Figura 40a).

Resultados semelhantes foram encontrados para o partenolido, nos quais também observa-se diminuição gradual dos níveis de IL-17 com o aumento da concentração desta lactona. Adicionalmente, verifica-se ainda que na maior concentração, 20  $\mu\text{M}$ , a redução da produção de IL-17 foi significativa (527 pg/mL), apresentando níveis inferiores que o próprio controle negativo (559 pg/mL) (Figura 40b).



**Figura 40.** Produção de IL-17 em cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE-induzidos, incubados com ácido caurenoico **(a)** ou partenolido **(b)**. Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5®, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM).

a  $p < 0,001$  CN  
b  $p < 0,001$  EAE

A fim de facilitar o entendimento dos resultados, a tabela abaixo mostra a porcentagem média de redução da produção de NO e citocinas dos grupos de células tratadas com ácido caurenoico e partenolido em relação ao grupo controle positivo (EAE).

Tabela 12. Porcentagem de redução de NO e citocinas pelo ácido caurenico e partenolido em comparação ao grupo positivo (EAE).

	NO	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-6	IL-17
<b>Controle negativo</b>	40,5%	28%	40,7%	36,8%	36,6%
<b>Ácido Caurenico (<math>\mu</math>M)</b>					
25	-	-	22,5%	23,2%	14,7%
50	34,5%	40,3%	43,5%	52,1%	45,2%
100	67,1%	59,3%	58,7%	59,8%	56,0%
<b>Partenolido (<math>\mu</math>M)</b>					
1	17,8%	-	5,5%	18,7%	5,1%
5	53,5%	-	9,0%	23,6%	45,4%
20	87,8%	34,7%	38,0%	44,4%	65,4%

Como descrito anteriormente a EAE é uma doença inflamatória do SNC, mediada por células TCD4<sup>+</sup>, e amplamente utilizada como modelo clínico experimental para o estudo da EM. Neste modelo murino da EAE, com imunização de camundongos C57Bl/6 pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub>, as células T apresentam alta reatividade à mielina, provocando lesões inflamatórias e desmielinizantes. Na EM, essas lesões são provocadas, entre outros fatores, por linfócitos Th1 e Th17, apresentando elevados níveis de IFN- $\gamma$  e ativação de macrófagos (com elevada produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em contrapartida, a recuperação está associada ao aumento das citocinas Th2 e Treg no SNC (STEINMAN, 1996; STEINMAN et al., 2005; BHOPALE et al., 2014).

A partir do conhecimento da imunopatologia da EM, muitos pesquisadores têm se esforçado para encontrar alternativas terapêuticas para o tratamento da EM (CHEN et al., 2010; DUTRA et al., 2012; FONTES et al., 2014). Atualmente, os produtos naturais continuam sendo uma das principais fontes de substâncias biologicamente ativas que podem servir de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios e imunomoduladores (FONTES et al., 2014).

Nesse sentido, estudos anteriores têm reconhecido o ácido caurenico e o partenolido como substâncias com habilidade de modular alguns importantes marcadores inflamatórios, os quais estão presentes na imunopatologia da EM

(CARLISI et al., 2011; CHOI et al., 2011; MIZOKAMI et al., 2012; ZHAO et al., 2012). Estes dados, portanto, nos encorajaram a investigar, pela primeira vez, os efeitos imunomodulatórios *in vitro* do ácido caurenóico e do partenólido sobre esplenócitos de camundongos C57Bl/6 EAE induzidos.

Para isso, avaliou-se a influência do ácido caurenóico e do partenólido sobre a ativação de macrófagos, pelo doseamento do NO, seus efeitos sobre as respostas Th1 (por meio do doseamento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e a resposta Th17 (pela determinação de IL-6 e IL-17).

Em relação ao ácido caurenóico, pode-se observar atividade sobre todos os mediadores avaliados, sendo que em alguns mediadores esta atividade foi expressiva somente nas maiores concentrações.

Avaliando-se inicialmente a ativação de macrófagos, pode-se observar que o ácido caurenóico foi capaz de reduzir a produção de NO nas duas maiores concentrações. Sendo que na concentração de 100  $\mu$ M foi capaz de reduzir significativamente a produção de NO. Sabe-se que o NO é um dos responsáveis pelo dano à bainha de mielina em EM e EAE. Além disso, NO possui propriedades citotóxicas e citostáticas e é produzido em grande quantidade pelos macrófagos e outras células do sistema imune (FONTES et al., 2014).

A esse respeito, estudos anteriores mostram que o ácido caurenóico age como inibidor da produção de mediadores químicos, tais como prostaglandinas E2, óxido nítrico, e as enzimas óxido nítrico sintase induzida (*iNOS*) e cicloxigenase tipo 2 (COX-2) de linhagens de macrófagos RAW 264,7 ativados por LPS (CHOI et al., 2011). Corroborando com nossos resultados, Choi e pesquisadores (2011) verificaram significativa diminuição da produção de NO pelo ácido caurenóico nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ M. No trabalho de Lim e colaboradores (2009) também foi observado uma diminuição da produção de NO na presença de 50  $\mu$ M de ácido caurenóico, no mesmo tipo celular. Já no trabalho de Díaz-Viciedo e colaboradores (2008), o ácido caurenóico apresentou diminuição da produção de NO em macrófagos RAW 264,7 ativados por LPS em concentrações menores (1 a 20  $\mu$ M).

Observa-se ainda, efeito sobre a resposta Th1, na qual o ácido caurenóico foi capaz de diminuir consideravelmente a produção de IFN- $\gamma$  nas três concentrações avaliadas. Semelhantemente ao observado para o NO, o ácido caurenóico na maior concentração foi capaz de reduzir a produção de IFN- $\gamma$  a valores próximos aos

encontrados no controle negativo. Além disso, nas duas maiores concentrações de ácido caurenico a produção de TNF- $\alpha$  foi reduzida consideravelmente.

As citocinas apresentam um papel essencial no estabelecimento e manutenção de desordens autoimunes, como na EM e EAE. Os linfócitos T são caracterizados pela produção de IFN- $\gamma$ , citocina envolvida tanto na ativação de macrófagos como na diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> em células Th1. Similarmente ao IFN- $\gamma$ , a citocina TNF- $\alpha$  está presente nas respostas Th1 e Th17, a qual desempenha um papel central na EM e EAE (CORRÊA et al., 2010; DUTRA et al., 2012; FLETCHER et al., 2010).

Em relação à resposta Th17, verifica-se expressiva atividade do ácido caurenico sobre as citocinas IL-6 e IL17. O ácido caurenico foi capaz de reduzir a produção de IL-6 e IL-17 em todas as concentrações avaliadas, sendo que na maior concentração também reduziu os valores destas citocinas aproximando aos valores encontrados no controle negativo.

Células Th17, recentemente identificado como um subconjunto distinto de células TCD4<sup>+</sup>, são capazes de mediar a patologia da EAE. Outra evidência demonstra que a neutralização de IL-17 ou inibição de células Th17 leva a melhora da EAE. Além da IL-17, outra citocina envolvida na resposta Th17 é a IL-6, conhecida por participar da inflamação e patologia da EAE. Sua ação pode ser diretamente através da ativação da microglia e astrócitos ou indiretamente, em conjunto com o TGF- $\beta$ , através da promoção da diferenciação e expansão de células Th17 (YANG et al., 2008; ALVES et al., 2012). Dessa forma, no presente trabalho foi demonstrado que o ácido caurenico diminuiu os níveis de IL-6, os quais podem ter afetado a produção de IL-17.

Estudos anteriores também demonstram a atividade do ácido caurenico sobre algumas das citocinas avaliadas no presente trabalho. No estudo de Díaz-Viciedo e colaboradores (2008) observam-se que o ácido caurenico, nas concentrações de 1 a 20  $\mu$ M, apresentou diminuição considerável da produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264,7 ativados por LPS. Além disso, Hueso-Falcon e colaboradores (2011) verificaram inibição da produção das citocinas IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por macrófagos RAW 264,7 ativados por LPS na presença do ácido caurenico.

Outros trabalhos também demonstram efeito *in vivo* do ácido caurenico. No trabalho de Mizokami e colaboradores (2012) o ácido caurenico (10mg/kg, via oral) diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  no modelo de inflamação aguda por carragenina em camundongos machos Swiss (MIZOKAMI et al., 2012).

O ácido caurenico também apresentou atividade em outros modelos inflamatórios, como na colite induzida em ratos Lewis. Nos experimentos conduzidos por Paiva e colaboradores (2002), o ácido caurenico (50 e 100 mg/Kg/dia) promoveu melhora clínica e diminuição de infiltrado inflamatório bem como diminuição de edemas na submucosa no segmento do cólon dos animais com a colite (PAIVA et al., 2002).

Diante da expressiva atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* desempenhada pelo ácido caurenico, muitos pesquisadores têm se esforçado para tentar elucidar o mecanismo de ação dessa substância.

No estudo conduzido por Choi e colaboradores (2011) verificou-se que o ácido caurenico foi capaz de inibir a ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B, o qual desempenha papel crucial nas respostas inflamatórias e imune. Este fator de transcrição está presente no citoplasma, ligado à proteína inibitória I $\kappa$ B em células não estimuladas. Quando as células são expostas aos estimulantes, I $\kappa$ B é fosforilada pelo complexo I $\kappa$ B quinase (IKK) e libera o NF $\kappa$ B, resultando na translocação deste para o núcleo, onde se ligará aos promotores de mediadores pro-inflamatórios, induzindo a expressão gênica de algumas citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, *iNOS* (CHOI et al., 2011). Outros trabalhos também relatam que diterpenos do tipo caurano têm demonstrado atividade anti-inflamatória através da inibição da ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B, em que tal inibição ocorre através de um mecanismo que envolve a diminuição da atividade de IKK (CASTRILLO et al., 2001; AQUILA et al., 2009).

Ao contrário dos trabalhos supracitados, outros estudos mostram que o ácido caurenico não inibe a ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B (LYU et al., 2011). Neste caso, este grupo de pesquisadores exploram outro mecanismo de ação pelo qual o ácido caurenico regula a inflamação, sugerindo uma ação através do gene Nrf2 (fator nuclear eritroide-relacionado ao fator 2), o qual tem um papel importante na melhora da inflamação (LYU et al., 2011).

Dessa forma, apesar destes estudos sobre os possíveis efeitos do ácido caurenico sobre as vias inflamatórias, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido.

Além dos promissores resultados encontrados para o ácido caurenico no presente trabalho, o partenolido também foi avaliado a respeito dos seus efeitos sobre os mesmos mediadores químicos envolvidos na imunopatologia da EAE.

Em relação à produção de NO, pode-se observar que o partenolido foi capaz, em concentração dependente, de inibir a produção de NO nas três concentrações avaliadas. Além disso, o partenolido, na maior concentração, reduziu os níveis de NO abaixo do encontrado no grupo de animais saudáveis.

Como descrito anteriormente, o NO está implicado na patogênese da EAE, e já se têm relatos na literatura comprovando a atividade do partenolido sobre este mediador (FIEBICH et al., 2002). Nestes estudos o partenolido inibiu a produção de NO em concentrações abaixo de 4  $\mu\text{M}$ , em células da microglia estimuladas por LPS e seu mecanismo de ação, para tal atividade, está relacionado à inibição da ativação da proteína quinase ativada por mitógeno p42/44, a qual faz parte da via de transdução que conduz à expressão de *iNOS* (FIEBICH et al., 2002).

Também foi observado em nosso trabalho que a produção de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17 foi consideravelmente reduzida após tratamento *in vitro* com partenolido em todas as concentrações avaliadas. Além disso, observa-se uma resposta concentração dependente para estas três citocinas. Esses resultados nos permitem sugerir uma atividade do partenolido sobre as respostas Th1 e Th17.

Estudos anteriores também relatam a atividade do partenolido sobre estas citocinas. No estudo conduzido por Li e colaboradores (2006) demonstrou-se que o partenolido, na concentração de 48  $\mu\text{M}$ , foi capaz de diminuir a produção de IFN- $\gamma$  e IL-6 em macrófagos RAW 267,4 estimulados por LPS. Já no estudo mais recente, Ku, Lin (2013) demonstraram que o partenolido apresentou diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$  em concentrações menores (0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$ ) em esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados por LPS.

Investigações em modelos inflamatórios *in vivo* também têm sido realizadas. No trabalho de Smolinski, Pestka (2005), camundongos B6C3F1 foram tratados intraperitonealmente durante 90 minutos com partenolido (5mg/kg) e LPS (1 mg/kg).

A seguir realizou-se a dosagem sérica de IL-6, observando-se uma redução de 35% de IL-6 comparando ao grupo tratado somente com LPS.

A diferenciação e função de células Th1 e Th17 é regulada por meio de uma rede complexa de citocinas e fatores de transcrição. A via JAK/STAT é uma das principais vias de sinalização que regula a diferenciação celular Th1 e Th17. Especificamente, STAT1 e STAT4 são membros importantes da família JAK/STAT envolvidos na diferenciação da resposta Th1. Em contraste, STAT3 é uma molécula chave na sinalização da resposta Th17, sendo ativada pela IL-6 e IL-23, induzindo a transcrição de IL-17 (QIN et al., 2010). Relatos anteriores indicam uma forte inibição do partenolido sobre o fator de transcrição STAT3, podendo ser uma importante via de inibição da produção de IL-17, a qual está diretamente implicada na patogênese da EAE (CARLISI et al., 2011; SKOUMAL et al., 2011).

Além desse provável mecanismo de ação, muitos pesquisadores têm relatado que a atividade anti-inflamatória desempenhada pelo partenolido ocorre também através da inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (HEHNER et al., 1999; GARCIA-PINERES et al., 2004; KWOK et al., 2001). Alguns trabalhos sugerem uma alquilação de um resíduo de cisteína p65 na subunidade NF- $\kappa$ B, o qual é necessário para a ligação com o DNA, impedindo, dessa forma, a ativação do fator de transcrição (GARCIA-PINERES et al., 2004). Outros, porém, afirmam que a alquilação ocorre com um resíduo de cisteína da alça de ativação da I $\kappa$ B quinase, impedindo assim a fosforilação e degradação de I $\kappa$ B, um passo necessário para a ativação de NF- $\kappa$ B (HEHNER et al., 1999).

Outros estudos sugerem que o grupamento epóxido e o anel  $\alpha$ -metileno  $\gamma$ -lactona do partenolido são os responsáveis por interagirem com diversos alvos biológicos (LIU et al., 2014). Know e colaboradores (2001) evidenciaram que a atividade anti-inflamatória do partenolido tanto *in vitro* como *in vivo* é mediada através do anel  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona. Estes pesquisadores demonstraram que a transformação desse grupo funcional, acarretou na perda da capacidade de ligação ao I $\kappa$ B quinase, facilitando assim a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (KNOW et al., 2001).

Resumidamente, foi demonstrado que o ácido caurenico apresentou resultados expressivos nas respostas Th1, Th17 e atividade de macrófagos, principalmente nas duas maiores concentrações avaliadas. Visto que diminui

consideravelmente, nestas concentrações, a produção de NO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17. Semelhantemente, o partenolido também agiu nas respostas Th1 e Th17, porém somente na maior concentração avaliada para o TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6, e nas duas maiores concentrações para a IL-17. Além disso, o partenolido diminuiu consideravelmente a produção de NO, de forma mais expressiva que o observado para ácido caurenóico.

## 6. CONCLUSÃO

Os extratos brutos das raízes de *S. sonchifolius* e das partes aéreas de *T. parthenium* foram produzidos e, a partir dos mesmos, foram isolados e purificados, respectivamente, o ácido caurenóico e o partenólido.

O ácido caurenóico e o partenólido foram avaliados, pela primeira vez, em ensaios imunomodulatórios *in vitro* frente à esplenócitos de camundongos C57Bl/6-EAE induzidos.

A análise dos dados obtidos permitem concluir que estas substâncias foram capazes de modular tanto a resposta Th1 quanto a Th17 *in vitro*, uma vez que reduziram a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17, bem como a produção de óxido nítrico.

Os resultados apresentados neste estudo revelam efeitos promissores tanto do ácido caurenóico quanto do partenólido frente a doenças inflamatórias, especialmente para a EAE.

Estudos adicionais devem ser realizados a fim de conhecer a atividade imunomodulatória destas substâncias em modelos *in vivo* de EAE, assim como investigar seus possíveis mecanismos de ação.

## REFERÊNCIAS

ABEM – Associação Brasileira de Esclerose Múltipla. Disponível em: <<http://www.abem.org.br/>>. Acessado em 06/06/2014.

ALVES, C.C.S.; CASTRO, S.B.R.; COSTA, C.F.; DIAS, A.T.; ALVEZ, C.J.; RODRIGUES, M.F.; TEIXEIRA, H.C.; ALMEIDA, M.V.; FERREIRA, A.P. Anthraquinone derivative O,O`- bis-(3`- iodopropyl) -1,4-dihydroxyanthraquinone modulates immune responses and improves experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v. 14, p. 127-132, 2012.

AMBROSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; COUTINHO, S.T.; OLIVEIRA, D.C.; OLIVEIRA, A.M.; DA COSTA, F.B. Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1407-1413, 2004.

AQUILA, S.; WENG, Z.Y.; ZENG, Y.Q.; SUN, H.D.; RIOS, J.L. Inhibition of NF-kappaB activation and *i*NOS induction by ent-kaurane diterpenoids in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1269–1272, 2009.

ARÁOZ, M.V.C.; MERCADO, M.I.; GRAU, A.; CATALÁN, C.A.N. Ent-kaurane derivatives from the root cortex of yacon and other three *Smallanthus* species (Heliantheae, Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1042–1048, 2010.

ARNOLD, K.; HIEN, T.T.; CHINH, N.T.; PHU, N.H.; MAI, P.P. A randomized comparative study of artemisinin (qinghaosu) suppositories and oral quinine in acute falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 499-502, 1990.

BARCELLONA, C.S.; CABRERA, W.M.; HONORÉ, S.M.; MERCADO, M.I.; SÁNCHEZ, S.S.; GENTA, S.B. Safety assessment of aqueous extract from leaf *Smallanthus sonchifolius* and its main active lactone, enhydrin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 362-370, 2012.

BARREIRO, E. J.; BOLZANO, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BATISTA, R.; BRAGA, F.C.; OLIVEIRA, A.B. Quantitative determination by HPLC of *ent*-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.15, n. 2, p. 119-125, 2005.

BATISTA, R.; GARCIA, P.A.; CASTRO, M.A.; DEL CORRAL, J.M.; FELICIANO, A.S.; DE OLIVEIRA, A.B. iso-Kaurenoic acid from *Wedelia paludosa* D.C. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 823–831, 2010.

BCTRIMS – Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa da Esclerose Múltipla. Disponível em: <[www.bctrims.org.br](http://www.bctrims.org.br)>. Acessado em 06/06/2013.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T.B.; OUKKA, M.; WEINER, H.L.; KUCHROO, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cell. **Nature**, v. 441, p. 235-238, 2006.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO V. Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature**, v. 453, p. 1051-1057, 2008.

BHOPALE, M.K.; HILLIARD, B.; CONSTANTINESCU, C.S.; FUJIOKA, T.; VENTURA, E.; PHILLIPS, S.M.; ROSTAMI, A. DAB389IL-2 suppresses autoimmune inflammation in the CNS and inhibits T cell-mediated lysis of glial target cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 96, n. 1, p. 108-117, 2014.

BISAGA, G.N.; ODINAK, M.M.; BOIKO, A.N.; MELNIK, Y.B.; POPOVA, N.F. Treatment of Exacerbations of Multiple Sclerosis without the Use of Corticosteroids: The Role of Metabolic and Antioxidant Therapy. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 42, n. 2, p. 123-27, 2012.

BLAKEMAN, J.P.; ATKINSON, P. Antimicrobial properties and possible role in host-pathogen interactions of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from glands of *Chrysanthemum parthenium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 15, p.183-192,1979;

BOECK, P. **Obtenção de moléculas bioativas a partir de substâncias naturais e sintéticas**. 2005. Tese (doutorado em química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

BOGDANOS, D.P.; SMYK, D.S.; RIGOPOULOU, E.I.; MYTILINAOIU, M.G.; HENEGHAN, M. A.; GERSHWIN, E. Twin studies in autoimmune disease: Genetics, gender and environment. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, p.156-169, 2012.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, E.P.; CABRINI, D.A.; PIZZOLATTI, M.G.; ZAMPRONIO, A.R.; OTUKI, M.F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute akin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 262-266, 2010.

BRESCIANI, L.F.V.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Comparative study of different parts of *Wedelia paludosa* by gas chromatography. **Natural Product Letters**, v. 14, n. 4, p. 247-254, 2000.

BROWN, A.M.G.; EDWARDS, C.M.; HARTMAN, T.P.V.; MARSHALL, J.A.; SMITH, R.M.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. Sexual hybrids of *Tanacetum*: biochemical, cytological and pharmacological characterization. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 333, p. 435-444, 1999.

CABANILLAS, J.G.Q. **Efeito da eletroacupuntura na qualidade de vida de pacientes com esclerose múltipla forma recorrente –remitente**. 2012. Tese (doutorado em química médica) - Faculdade de Ciência Médicas – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CALLEGARO, D.; DE LOLIO, C.A.; RADVANY, J.; TILBERY, C.P.; MENDONÇA, R.A.; MELO, A.C. Prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, in 1990. **Neuroepidemiology**, v. 11, n. 1, p. 11-14, 1992.

CALLEGARO, D.; GOLDBAUM, M.; MORAIS, L.; TILBERY, C.P.; MOREIRA, M.A.; GABBAI, A.A.; SACAFF, M. The prevalence of multiple sclerosis in city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 104, p. 208-213, 2001.

CARLISI, D.; D'ANNEO, A.; ANGILERI, L.; LAURICELLA, M.; EMANUELE, S.; SANTULLI, A.; VENTO, R.; TESORIERE, G. Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 6, p. 1632-1641, 2011.

CARVALHO, L.M. **Artemísia**. Aracaju, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 17 p. – (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN1678-1953; 144). Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=fixas&pagina=publicacoesonline>> Acesso em 20 ago. 2014.

CASTRILLO, A.; DE LAS HERAS, B.; HORTELANO, S.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A.; BOSCA, L. Inhibition of the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF- $\kappa$ B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 15854–15860, 2001.

CASTRO, S.B.; JUNIOR, C.O.; ALVES, C.C.; DIAS, A.T.; ALVES, L.L.; MAZZACCOLI, L.; MESQUITA, F.P.; FIGUEIREDO, N.S.; JULIANO, M.A.; CASTANON, M.C.; GAMEIRO, J.; ALMEIDA, M.V.; TEIXEIRA, H.C.; FERREIRA, A.P. Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetradecanoyl-genistein treatment. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 2, p. 465-470, 2012.

CHASTAIN, E.M.L.; DUNCAN, D.S.; RODGERS, J.M.; MILLER, S.D. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1812, p. 265–274, 2011.

CHEN, X.; PI, R.; ZOU, Y.; LIU, M.; MA, X.; JIANG, Y.; MAO, X.; HU, X. Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice by osthole, a natural coumarin. **European Journal of Pharmacology**, v. 629, p. 40–46, 2010.

CHIBA, K.; ADACHI, K. Sphingosine 1-Phosphate receptor 1 as a useful target for treatment of multiple sclerosis. **Pharmaceuticals**, v. 5, p. 514-528; 2012.

CHOI, R.J.; SHIN, E.M.; JUNG, H.; CHOI, J.S.; KIM, Y.S. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, p. 677–682, 2011.

CHU, X.; CI, X.; WEI, M.; YANG, X.; CAO, Q.; GUAN, M.; LI, H.; DENG, Y.; FENG, H.; DENG, X. Licochalcone a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory

response *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 15, p. 3947-3954, 2012.

CORRÊA, J.O.A.; AARESTRUP, B.J.V.; AARESTRUP, F.M. Effect of thalidomide and pentoxifylline on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Experimental Neurology**, v. 226, p. 15–23, 2010.

COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 58-66, 2009.

COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDONZA, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 $\beta$ -hydroxykaurenoic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2821-2826, 2004.

CROXFORD, A.L.; KURSCHUS, F.C.; WAISMAN, A. Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 182, n. 3, p. 1237-1241, 2010.

CUA, D.J.; HUTCHINS, B.; LAFACE, D.M.; STOHLMAN, S.A.; COFFMAN, R.L. Central nervous system expression of IL-10 inhibits autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 602-608, 2001.

DAI, H.; CIRIC B.; ZHANG, G.; ROSTAMI, A. Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Bowman–Birk inhibitor. **Journal of Neuroimmunology**, v. 245, p. 1–7, 2012.

DAMY, S.B.; CAMARGO, R.S.; CHAMMAS, R.; De FIGUEIREDO, L.F.P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 103-111, 2010.

DENIC, A.; JOHNSON, A.J.; BIEBER, A.J.; WARRINGTON, A.E.; RODRIGUEZ, M.; PIRKO, I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. **Pathophysiology**, v. 18, p. 21-29, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, John Wiley & Sons, 1997.

DIAZ-VICIEDO, R.; HORTELANO, S.; GIRON, S.N.; MASSO, J.M.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A.; DE LAS HERAS, B. Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, p. 761–766, 2008.

DING, A.; NATHAN, C.F.; STUER, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407-2503, 1988.

DOLMAN, D.M.; KNIGHT, D.W.; SALAN, U.A. A quantitative method for the estimation of parthenolide and other sesquiterpene lactones containing  $\alpha$ -methylenebutyrolactone functions present in feverfew, *Tanacetum parthenium*. **Phytochemical Analyses**, v. 3, p. 26-31, 1992.

DUTRA, R.C.; De SOUZA, P.R.C.; BENTO, A.F.; MARCON, R.; BICCA, M.A.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 531-542, 2012.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 69-75, 2001.

FDA.U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm345528.htm> e <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm319277.htm>  
Acesso: 06/01/2013.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; YOU, S.; MCGRATH, B.C.; CAVENER, D.R.; VACCA, C.; ORABONA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M.L.; VOLPI, C.; SANTAMARIA, P.; FIORETTI, M.C.; PUCCETTI, P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 6752–6761, 2006.

FARIAS, A.S.; DE LA HOZ, C.; CASTRO, F.R.; OLIVEIRA, E.C.; RIBEIRO DOS REIS, J.R.; SILVA, J.S.; LANGONE, F.; SANTOS, L.M. Nitric oxide and TNF $\alpha$  effects in experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, p. 32-38, 2007.

FEINSTEIN, A.; DELUCA, J.; BAUNE, B.T.; FILIPPI, M.; LASSMAN, H. Review: Cognitive and neuropsychiatric disease manifestations in MS. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 2, p. 4–12, 2013.

FENG, M.; SHU, Y.; YANG, Y.; ZHENG, X.; LI, R.; WANG, Y.; DAI, Y.; QIU, W.; LU, Z.; HU, X. Ulinastatin attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing anti-inflammatory responses. **Neurochemistry International**, v. 64, p. 64–72, 2014.

FERBER, I.A.; BROCKE, S.; TAYLOR-EDWARDS, C.; RIDGWAY, W.; DINISCO, C.; STEINMAN, L.; DALTON, D.; FATHMAN, C.G. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Journal of Immunology**, v. 156, n. 1, p. 5-7, 1996.

FIEBICH, B.L.; LIEB, K.; ENGELS, S.; HEINRICH, M. Inhibition of LPS-induced p42/44 MAP kinase activation and *i*NOS/NO synthesis by parthenolide in rat primary microglial cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 132, p. 18–24, 2002.

FIGUEROA-VEJA, N.; MAJANO, P.; LARRAÑAGA, E.; BRAVO, J. M.; RODRÍGUEZ-RAMOS, R.; GONZÁLEZ-AMARO, R.; MARAZUELA, M. Inducible nitric oxide synthase (*i*NOS) expression in autoimmune thyroid disorders (AITD). **Endocrinología y Nutrición**, v. 55, p. 340–345, 2008.

FLETCHER, J.M.; LALOR, S.J.; SWEENEY, C.M.; TUBRIDY, N.; MILLS, K.H.G. T cell in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 162, p. 1-11, 2010.

FONTES, L.B.A. **Avaliação dos efeitos da Licochalcona A e do trans-cariofileno sobre a encefalomielite autoimune experimental (EAE)**. 2013. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

FONTES, L.B.A.; DIAS, D.S.; DE CARVALHO, L.S.A.; MESQUITA, H.L.; REIS, L.S.; DIAS, A.T.; DA SILVA FILHO, A.A.; CORRÊA, J.O.A. Immunomodulatory effects of licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2014.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; TAGO, K.; NISHIZAWA, C.; TAKAHASHI, K.; MASHINO, T.; IWATA, S.; INOUE, H.; SONODA, Y.; KASAHARA, T. Licochalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jak2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 12, p. 1681–1693, 2008.

FURUSAWA, J.; FUNAKOSHI-TAGO, M.; MASHINO, T.; TAGO, K.; INOUE, H.; SONODA, Y.; KASAHARA, T. *Glycyrrhiza inflata*-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF-kappaB p65 in LPS signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 499-507, 2009.

GARCÍA-PIÑERES, A.J.; LINDENMEYER, M.T.; MERFORT, I. Role of cysteine residues of p65/NF-κB on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. **Life Sciences**, v. 75, p. 841–856, 2004.

GASPERINI, C.; RUGGIERI, S.; MANCINELLI, C.R.; POZZILLI, C. Advances in the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis–critical appraisal of fingolimod. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 9, p. 73-85, 2013.

GEARING, A.J.H.; NEWMAN, W. Circulating Adhesion Molecules in Disease. **Immunology Today**, v. 14, p. 506-512, 1993.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R.M. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary *in vivo* evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 170–178, 2013.

GRECO, R.; TASSORELLI, C.; MANGIONE, A.S.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; NAPPI, G. From standard *Tanacetum parthenium* extract to a

stabilized derivative of parthenolide: studies in animal models of Pain. **Herbal Medicines**, p. 307-315, 2012.

HALLAL, D.E.M.; FARIAS, A.S.; OLIVEIRA, E.C.; DIAZ-BARDALES, B.M.; BRANDAO, C.O.; PROTTI, G.G.; PEREIRA, F.G.; METZE, I.L.; SANTOS, L.M. Costimulatory molecules expression on leukocytes from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with IFN beta. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 23, n. 6, p. 293-298, 2003.

HARBO, H.F.; GOLD, R.; TINTORÉ, M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 6, p. 237-248, 2013.

HARTUNG, H. P.; REINERS, K.; ARCHELOS, J.J.; MICHELS, M.; SEELDRAYERS, P.; HEIDENREICH, F.; PFLUGHAUPT, K.W.; TOYKA, K.V. Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. **Annals of Neurology**, v. 38, p. 186-193, 1995.

HAUSER S.L.; OKSENBERG J.R. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 61-76, 2006.

HEHNER, S.; HOFMANN, T.; DROEGE, W.; SCHMITZ, M. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- $\kappa$ B by targeting the I $\kappa$ B kinase complex. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 5617–5623, 1999.

HENDRIKS, H.; ANDERSON-WILDEBOER, Y.; ENGELS, G.; BOS, R.; WOERDENBAG, H.J. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. **Planta Medica**, v. 63, p. 356-359, 1997.

HEPPNER, F.L.; GRETER, M.; MARINO, D.; FALSIG, J.; RAIVICH, G.; HOVELMEYER, N.; WAISMAN, A.; RULICKE, T.; PRINZ, M.; PRILLER, J.; BECHER, B.; AGUZZI, A. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. **Nature Medicine**, v. 11, p. 146-152, 2005.

HEPTINSTALL, S.; AWANG, D. V.; DOWSON, B. A.; KINDACK, D.; KNIGHT, D.W.; MAY, J. Parthenolide content and bioactivity of feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip). Estimation of commercial and authenticated feverfew products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 391-395, 1992.

HEWLETT, M.J.; BEGLEY, M.J.; GROENEWEGEN, W.A.; HEPTINSTALL, S.; KNIGHT, D.W.; MAY, J.; SALAN, U.; TOPLIS, D. Sesquiterpene lactones from feverfew, *Tanacetum parthenium*: isolation, structural revision, activity against human blood platelet function and implications for migraine therapy. **Journal of the Chemical Society**, p. 1979-1986, 1996.

HUESO-FALCÓN, I.; CUADRADO, I.; CIDRE, F.; AMARO-LUIS, J.M.; RAVELO, A.G.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; DE LAS HERAS, B.; HORTELANO, S. Synthesis and anti-inflammatory activity of ent-kaurene derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1291-1305, 2011.

IZUMI, E.; MORELLO, L.G.; UEDA-NAKAMURA, T.; YAMADA-OGATTA, S.F.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P.; MORGADO-DIAZ, J.A.; NAKAMURA, C.V. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 324–330, 2008.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 55, p. 2994–3001, 2012.

JANDER, S.; POHL, J.; D'URSO, D.; GILLEN, C.; STOLL, G. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. **The American Journal of Pathology**, v. 152, p. 975-982, 1998.

KAKALACHEVA, K.; LÜNEMANN, J.D. Environmental triggers of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 585, p. 3724–3729, 2011.

KAPLAN, M.; SIMMONDS, M.R.; DAVIDSON, G. Comparasion of supercritical fluid and solvent extraction of feverfew (*Tanacetum parthenium*). **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26, p. 473-480, 2002.

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

KHOURY, S.J.; HANCOCK, W.W.; WEINER, H.L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with down regulation of inflammatory cytokines and differential up regulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, p. 1355-1364, 1992.

KIM, S.L.; TRANG, K.T.T.; KIM, S.H.; KIM, I.H.; LEE, S.O.; LEE, S.T.; KIM, D.G.; KIM, S.W. Parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of colorectal cancer cells by inducing mitochondrial dysfunction and apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 4, p. 1547-1553, 2012.

KIM, S.L.; KIM, S.H.; TRANG, K.T.T.; KIM, I.H.; LEE, S.O.; LEE, S.T.; KIM, D.G.; KANG, S.B.; KIM, S.W. Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil in combination with parthenolide in human colorectal cancer. **Cancer Letters**, v. 335, p. 479–486, 2013.

KU, C.; LIN, J. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoids compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1104-1113, 2013.

KUMAR, D.R.; ASLINIA, F.; YALE, S.H.; MAZZA, J.J. Jean-Martin Charcot: the father of neurology. **Clinical Medicine and Research**, v. 9, n. 1, p. 46-49, 2011.

KWOK, B.H.B.; KOH, B.; NDUBUISI, M.I.; ELOFSSON, M.; CREWS, C.M. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits I $\kappa$ B kinase. **Chemistry and Biology**, v. 8, p. 759-766, 2001.

LACHMAN, J.; FERNÁNDEZ, E.C.; VIEHMANNOVÁ, I.; ŠULC, M.; ČEPKOVÁ, P. Total phenolic content of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) rhizomes, leaves, and roots affected by genotype. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 35, p. 117-123, 2007.

LEE, D.H.; GOLD, R.; LINKER, R.A. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and neurodegenerative diseases: therapeutic modulation via fumaric acid esters. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11783-11803, 2012.

LEHMANN-HORN, K.; KRONSBELN, H.C.; WEBER, M.S. Targeting B cells in the treatment of multiple sclerosis: recent advances and remaining challenges. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 6, n. 3, p. 161-173, 2013.

LI, X.; CUI, X.; LI, Y.; FITZ, Y.; HSU, L.; EICHACKER, P.Q. Parthenolide has limited effects on nuclear factor-kappa-beta increases and worsens survival in lipopolysaccharide-challenged C57BL/6J mice. **Cytokine**, v. 33, p. 299–308, 2006.

LIM, H.; JUNG, H.A.; CHOI, J.S.; KIM, Y.S.; KANG, S.S.; KIM, H.P. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 9, p. 1237-1243, 2009.

LINKER, R.A.; LEE, D.; RYAN, S.; VAN DAM, A.M.; CONRAD, R.; BISTA, P.; ZENG, W.; HRONOWSKY, X.; BUKO, A.; CHOLLATE, S.; ELLRICHMANN, G.; BRUCK, W.; DAWSON, K.; GOELZ, S.; WIESE, S.; SCANNEVIN, R.H.; LUKASHEV, M.; GOLD, R. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Brain**, v. 134, n. 3, p. 678-692, 2011.

LIU, Q.; MANZANO, D.; TANIĆ, N.; PESIC, M.; BANKOVIC, J.; PATERAKI, I.; RICARD, L.; FERRER, A.; DE VOS, R.; DE KROL, S.V.; BOUWMEESTER, H. Elucidation and in planta reconstitution of the parthenolide biosynthetic pathway. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 145–153, 2014.

LONGHINI, A.L.F. **Participação das células dendríticas plasmocitóides na esclerose múltipla e na encefalomielite autoimune experimental**. 2012. Tese (doutorado em clínica médica) – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

LUBLIN, F.D.; REINGOLD, S.C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee On Clinical Trials Of New Agents In Multiple Sclerosis. **Neurology**, v. 46, p. 907-911, 1996.

LUBLIN, F.D. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 256, p. 14-18, 2007.

LUCCHINETTI, C.F.; BOGDAN, F.G.; POPESCU, M.D.; REEM, F.B.; MOLL, N.M.; ROEMER, S.F.; LASSMANN, H.; BRÜCK, W.; PARISI, J.E.; SCHEITHAUER, B.W.; GIANNINI, C.; WEIGAND, S.D.; MANDREKAR, J.; RANSOHOFF, R.M. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2188-2197, 2011.

LUDWIN, S.K. The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 4, p. 305-318, 2006.

LUNIN, S.M.; GLUSHKOVA, O.V.; KHRENOV, M.O.; NOVOSELOVA, T.V.; PARFENYUK, S.B.; FESENKO, E.E.; NOVOSELOVA, E.G. Thymic peptides restrain the inflammatory response in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunobiology**, v. 218, p. 402–407, 2013.

LYU, J.H.; LEE, G.S.; KIM, K.H.; KIM, H.W.; CHO, S.I.; JEONG, S.I.; KIM, H.J.; JU, Y.S.; KIM, H.K.; SADIKOT, R.T.; CHRISTMAN, J.W.; OH, S.R.; LEE, H.K.; AHN, K.S.; JOO, M. Ent-kaur-16-en-19-oic Acid, isolated from the roots of *Aralia continentalis*, induces activation of Nrf2. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, 1442-1449, 2011.

MACHADO, S.R.; OLIVEIRA, D.M.T.; DIP, M.R.; MENEZES, N.L. Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (*Asteraceae*). **Revista Brasileira Botânica**, v. 27, n. 1, p.115-123, 2004.

MAGNI, P.; RUSCICA, M.; DOZIO, E.; RIZZI, E.; BERETTA, G.; FACINO, R.M. Parthenolide inhibits the LPS-induced secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B nuclear translocation in BV-2 microglia. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 9, p. 1405-1409, 2012.

MAJDI, M.; LIU, Q.; KARIMZADEH, G.; MALBOOBI, M.A.; BEEKWILDER, J.; CANKAR, K.; DE VOS, R.; TODOROVIC, S.; SIMONOVIC, A.; BOUWMEESTER, H. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). **Phytochemistry**, v. 72, p. 1739–1750, 2011.

MALEK, R.; BOROWICZ, K.K.; JARGIELLO, M.; CZUCZWAR, S.J. Role of nuclear factor B in the central nervous system. **Pharmacological Report**, v. 59, p. 25–33, 2007.

MARANGONI, A. L. **Potencialidade de aplicação de farinha de Yacon (*Polymnia sonchifolia*) em produtos à base de cereais**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARTÍNEZ, I.I.; PUERTA, C.; REDONDO, C.; GARCÍA-MERINO, A. Type IV phosphodiesterase inhibition in experimental allergic encephalomyelitis of Lewis rats: Sequential gene expression analysis of cytokines, adhesion molecules and the inducible nitric oxide synthase. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 164, p. 13–23, 1999.

MATSUMOTO, S.; VARELA, R.M.; PALMA, M.; MOLINILLO, J.M.G.; LIMA, I.S.; BARROSO, C.G.; MACÍAS, F.A. Bio-guided optimization of the ultrasound-assisted extraction of compounds from *Annona glabra* L. leaves using the etiolated wheat coleoptile bioassay. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 1578–1584, 2014.

MELO, A.C.; COTA, B.B.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 40-45, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas, v. 2, ed. 2, p. 181-202, 2010.

MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769–4807, 2011.

MIX, E.; MEYER-RIENECKER, H.; ZETTL, U.K. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. **Journal of Neurology**, v. 255, n. 6, p. 7-14, 2008.

MIX, E.; MEYER-RIENECKER, H.; HARTUNG, H.P.; ZETTL, U.K. Animal models of multiple sclerosis: Potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v. 92, p. 386-404, 2010.

MIZOKAMI, S.S.; ARAKAWA, N.S.; AMBROSIO, S.R.; ZARPELON, A.C.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI JR, W.A. Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: effect on cytokine production and activation of the NO–Cyclic GMP–Protein Kinase G–ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Journal Natural Products**, v. 75, p. 896–904, 2012.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOREIRA, M.A.; LANA-PEIXOTO, M.A.; CALLEGARO, D.; HAUSSEN, S.R.; DA GAMA, P.D.; GABBAI, A.A.; DA ROCHA, F.C.G.; LINO, A.M.M. Consenso expandido do bctrimis para o tratamento da esclerose múltipla: As evidências para o uso de glicocorticoides e Imunomoduladores. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, p. 875-880, 2002.

MORRIS, K.; YIANNIKAS, C. Treatment update in multiple sclerosis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 12, p. 246–254, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, N.A.; CAETANO, B.F.R.; SIVIERI, K.; URBANO, L.H.; CABELLO, C.; RODRIGUES, M.A.M.; BARBISAN, L.F. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2902–2910, 2012.

MURTA, V.; FERRARI, C.C. Influence of peripheral inflammation on the progression of multiple sclerosis: Evidence from the clinic and experimental animal models. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 53, p. 6-13, 2013.

NABAS, F.; CONTESINI, F.J.; MENIN, S.E.A.; ANTÔNIO, M.A.; BIGHETTI, A.E.; ARAÚJO, C.E.P.; CARVALHO, P.O. Antiedematous effect of oils containing the fatty acids Omega-3 and 6 in mice. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. 4, p. 92-96, 2009.

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. **Plantas medicinais: guia para profissionais de saúde**. São Paulo: Premier, 2002. 308 p.

NEWMAN, T.A.; WOOLLEY, S.T.; HUGHES, P.M.; SIBSON, N.R.; ANTHONY, D.C.; PERRY, V.H. T-cell and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. **Brain**, v. 124, p. 2203-2214, 2001.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C.L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 40-46, 2011.

OJEDA, E.; DÍAZ-CORTES, D.; ROSALES, D.; DUARTE-REY, C.; ANAYA, J.M.; ROJAS-VILLARRAGA, A. Prevalence and clinical features of multiple sclerosis in Latin America. **Clinical neurology and neurosurgery**, v. 115, p. 38-41, 2013.

OKOYE, T.C.; AKAH, P.A.; OMEJE, E.O.; OKOYE, F.B.V.; NWORU, C.S. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 38-43, 2013.

OLIVEIRA, B.H.; SANT'ANA, A.E.; BASTOS, D.Z. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 6, p. 368-371, 2002.

OSBORN, L.; HESSION, C.; TIZARD, R.; VASSALLO, C.; LUHOWSKYJ, S.; CHI-ROSSO, G.; LOBB, R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. **Cell**, v. 59, p. 1203-1211, 1989.

OUADGHIRI, S.; EL ALAOUI TOUSSI, K.; BRICK, C.; AIT BENHADDOU, E.H.; BENSEFFAJ, N.; BENOMAR, A.; EL YAHYAOU, M.; ESSAKALLI, M. Genetic factors and multiple sclerosis in the Moroccan population: A role for HLA class II. **Pathologie Biologie**, v. 61, p. 259-263, 2013.

OUYANG, W.; KOLLS J.K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454-467, 2008.

PADLA, E.P.; SOLIS, L.T.; RAGASA, C.Y. Antibacterial and antifungal properties of ent-kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 5, p. 408–414, 2012.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOME, A.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303-307, 2002.

PAVIA, D.L.; KRIZ, G.S.; LAMPMAN, G.M. **Introdução À Espectroscopia** - Tradução da 4ª Edição Norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PENDER, M. Epstein–Barr vírus in the multiple sclerosis brain—An evasive culprit. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 1, p. 61–63, 2012.

PERON, J.P.S.; YANG, K.; CHEN, M.L.; BRANDAO, W.N.; BASSO, A.S.; COMMODARO, A.G.; WEINER, H.L.; RIZZO, L.V. Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 227, p. 10-17, 2010.

PEZAVENTO, S.F.G.Z.; MINICUCCI, F.C.; FRANÇA, T.G.D.; ISHIKAWA, L.L.W.; ROSA, L.C.; MARQUES, C.; IKOMA, M.R.V.; SARTORI, A. Persistent inflammation in the CNS during chronic EAE despite local absence of IL-17 production. **Mediators of inflammation**, v. 2013, Article ID 519627, 10 páginas, 2013.

PFÄFFENRATH, V.; DIENER, H.C.; FISCHER, M.; FRIEDE, M.; ZEPPELIN, H.H.H. The efficacy and safety of *Tanacetum parthenium* (feverfew) in migraine prophylaxis - a double-blind, multicentre, randomized placebo controlled dose-response study. **Cephalalgia**, v. 22, p. 523-532, 2002.

PÖLLINGER, B. IL-17 producing T cells in mouse models of multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 6, p. 613-624, 2012.

QIN, X.; GUO, B.T.; WAN, B.; FANG, L.; LU, L.; WU, L.; ZANG, Y.Q.; ZHANG, J.Z. Regulation of Th1 and Th17 cell differentiation and amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural product compound berberine. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 3, p. 1855-1863, 2010.

ROBINSON, H. Studies in the Heliantheae (Asteraceae). XII. Re-establishment of the genus *Smallanthus*. **Phytologia**, v. 39, p. 47–53, 1978.

RUFATTO, L.C.; FINIMUNDY, T.C.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S. *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 20, p. 883– 889, 2013.

RUMMEL, C.; GERSTBERGER, R.; ROTH, J.; HUEBSCHLE, T. Parthenolide attenuates LPS-induced fever, circulating cytokines and markers of brain inflammation in rats. **Cytokine**, v. 56, n. 3, p. 739-748, 2011.

SELMI, C.; PAPINI, A.M.; PUGLIESE, P.; ALCARO, M.C.; GERSHWIN, M.E. Environmental pathways to autoimmune diseases: the cases of primary biliary cirrhosis and multiple sclerosis. **Archives of Medical Science**, v. 7, n. 3, p. 368-380, 2011.

SILVA, F.V.G. **Esclerose múltipla: produção de citocinas pelos linfócitos Th17 e Th1 de pacientes tratados ou não com interferon beta e quantificação das células dendríticas plasmocitóides no liquid cefalorraquiano**. 2010. Dissertação (mestrado em Ciências médicas) – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SILVA, C.B. **Avaliação do potencial biológico de óleos essenciais e extratos orgânicos de folhas de *Indigofera suffruticosa***. 2014. Tese (doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2014.

SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; ANDRENŠEK, S.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, p. 89–98, 2003.

SKOUMAL, R.; TÓTH, M.; SERPI, R.; RYSÄ, J.; LESKINEN, H.; ULVILA, J.; SAIHO, T.; ARO, J.; RUSKOaho, H.; SZOKODI, I.; KERKELÄ, R. Parthenolide inhibits STAT3 signaling and attenuates angiotensin II-induced left ventricular hypertrophy via modulation of fibroblast activity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 50, n. 4, p. 634-641, 2011.

SMOLINSKI, A.T.; PESTKA, J.J. Comparative effects of the herbal constituent parthenolide (Feverfew) on lipopolysaccharide-induced inflammatory gene expression in murine spleen and liver. **Journal of Inflammation**, v. 2, p. 1-8, 2005.

SOSA-SEQUERA, M.C.; SUAREZ, O.; DALO, N.L. Kaurenic acid: an *in vivo* experimental study of its anti-inflammatory and antipyretic effects. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 5, p. 293-296, 2010.

SOUCEK, M.; HEROUT, V.; SORM, F. On terpenes. Part. CXVII. Constitution of Parthenolide. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 26, p. 803-809, 1961.

SPRINGER, T.A. Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multiple Step Paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301-314, 1994.

STEINMAN, R.M. Dendritic cells and immune-based therapies. **Experimental Hematology**, v. 24, p. 859-862, 1996.

STEINMAN, R.M.; BONIFAZ, L.; FUJII, S.; LIU, K.; BONNYAY, D.; YAMAZAKI, S.; PACK, M.; HAWIGER, D.; IYODA, T.; INABA, K.; NUSSENZWEIG, M.C. The innate functions of dendritic cells in peripheral lymphoid tissues. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 560, p. 83-97, 2005.

THÖNE, J.; ELLRICHMANN, G.; FAUSTMANN, P.M.; GOLD, R.; HAGHIKIA, A. Anti-inflammatory effects of levetiracetam in experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v. 14, p. 9-12, 2012.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; DA COSTA, F.B.; COUTINHO, S.T.; DE OLIVEIRA, D.C.R.; DE OLIVEIRA, A.M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, p. 233–241, 2004.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; DA COSTA, F.B.; DE OLIVEIRA, A.M. Diterpenes: A therapeutic promise for cardiovascular diseases. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, v. 3, p. 1-8, 2008.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 176–182, 2005.

TULLMAN, M. J. Overview of the epidemiology, diagnosis, and disease progression associated with Multiple Sclerosis. **The American Journal of Managed Care**, v. 19, n. 2, p. 15-20, 2013.

UCHI, H.; ARRIGHI, J.; AUBRY, J.; FURUE, M.; HAUSER, C. The sesquiterpene lactone parthenolide inhibits LPS- but not TNF- $\alpha$ -induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells by inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 2, p. 269-276, 2002.

UCHIBORI, R.; TSUKAHARA, T.; MIZUGUCHI, H.; SAGA, Y.; URABE, M.; MIZUKAMI, H.; KUME, A.; OZAWA, K. NF- $\kappa$ B Activity Regulates Mesenchymal Stem Cell Accumulation at Tumor Sites. **Cancer Research**, v. 73, n. 1, p. 364-372, 2013.

VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii*: prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, v. 147, n. 2, p. 119–130, 2003.

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; FURLAN, M.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.S. Tropical biodiversity: Has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R.J.; ATKINS, C.J.; LOCKSLEY, R.M.; STOCKINGER, B. TGF- $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, p. 179-189, 2006.

VILEGAS, J.H.Y.; DE MARCHI, E.; LANÇAS, F.M. Determination of Coumarin and Kaurenoic Acid in *Mikania glomerata* ("Guaco") Leaves by Capillary Gas Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 2, p. 74-77, 1997.

VOSKUHL, R.R.; PITCHEKIAN-HALABI, H.; MACKENZIE-GRAHAM, A.; MCFARLAND, H.F.; RAINE, C.S. Gender differences in autoimmune demyelination in the mouse: implications for multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 39, n. 6, p. 724-733, 1996.

WALKER, C. A; HUTTNER, A. J.; O'CONNOR, K. C. Cortical injury in multiple sclerosis; the role of the immune system. **BMC Neurology**, v.11, p.152-4, 2011.

WALSHE-ROUSSEL, B.; CHOUEIRI, C.; SALEEM, A.; ASIM, M.; CAAL, F.; CAL, V.; ROJAS, M.O.; PESEK, T.; DURST, T.; ARNASON, J.T. Potent anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena* (L.) R. Br. Ex Cass., a Q'eqchi Maya traditional medicine. **Phytochemistry**, v. 92, p. 122-127, 2013.

WANG, H.H.; DAÍ, Y.Q.; QIU, W.; LU, Z.Q.; PENG, F.H.; WANG, Y.G.; BAO, J.; LI, Y.; HU, X.Q. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1313-1317, 2011.

WANG, X.; MA, C.; WU, J.; ZHU, J. Roles of T helper 17 cells and Interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on Multiple Sclerosis and Guillain-Barré syndrome as well as their animal models. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, p. 871-881, 2013.

WEBER, M. S.; MENGE, T.; LEHMANN-HORN, K.; KRONSBEIN, H.C.; ZETTL, U.; SELLNER, J.; HEMMER, B.; STÜVE, O. Current treatment strategies for Multiple Sclerosis - Efficacy versus neurological adverse effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 2, p. 209-219, 2012.

WEI, L.; LAURENCE, A.; ELIAS, K.M.; O'SHEA J.J. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 34605–34610, 2007.

WEINER, H.L. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease. **Annals of Neurology**, v. 65, p. 239-248, 2009.

WELLS, J.R. A taxonomic study of *Polymnia* (Compositae). **Brittonia**, v. 17, p. 144–159, 1965.

WILLIAMS, C.A.; HOULT, J.R.S.; HARBONE, J.B.; GREENHAM, J.; EAGLES, J. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 267-270, 1995.

YAMAOKA, S.; COURTOIS, G.; BESSIA, C.; WHITESIDE, S.T.; WEIL, R.; AGOU, F.; KIRK, H.E.; KAY, R.J.; ISRAEL, A. Complementation cloning of NEMO, a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation. **Cell**, v. 93, p. 1231–1240, 1998.

YANG, X.O.; PAPPU, B.P.; NURIEVA, R.; AKIMZHANOV, A.; KANG, H.S.; CHUNG, Y. MA, L.; SHAH, B.; PANOPOULOS, A.D.; SCHLUNS, K.S.; WATOWICH, S.S.; TIAN, Q.; JETTEN, A.M.; DONG, C. T helper 17 lineage differentiation is

programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. **Immunity**, v. 28, p. 29-39, 2008.

ZANDIEH, A.; IZAD, M.; FAKHRI, M.; AMIRIFARD, H.; KHAZAEIPOUR, Z.; HARIRCHIAN, M.H. Cytometric profiling in various clinical forms of multiple sclerosis with respect to CD21<sup>+</sup>, CD32<sup>+</sup>, and CD35<sup>+</sup> B and T cells. **Translational Neurodegeneration**, v. 2, 2013.

ZHANG, D.; CHENG, L.; HUANG, X.; SHI, W.; XIANG, J.Y.; GAN, H.T. Tetrandrine ameliorates dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice through inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation. **International Journal Colorectal Disease**, v. 24, p. 5–12, 2009.

ZHAO, Z.J.; XIANG, J.Y.; LIU, L.; HUANG, X.L.; GAN, H.T. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway, ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 169-174, 2012.

ZHOU, L.; IVANOV, I.I.; SPOLSKI, R.; MIN R.; SHENDEROV, K.; EGAWA T., IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v. 8, p. 967–974, 2007.

ZOU, J; CREWS, F.T. Inflammasome-IL-1b signaling mediates ethanol inhibition of hippocampal neurogenesis. **Frontiers in Neurogenesis**, v. 6, n. 77, 2012.