

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

**Lívia Beatriz Almeida Fontes**

**“Avaliação dos efeitos da Licochalcona A e do *trans*-  
cariofileno sobre a encefalomielite autoimune experimental  
(EAE)”**

**Juiz de Fora - MG**

**2013**

**Lívia Beatriz Almeida Fontes**

**Avaliação dos efeitos da Licochalcona A e do *trans*-  
cariofileno sobre a encefalomielite autoimune experimental  
(EAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração: Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa - Orientador

Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho- Co-Orientador

**Juiz de Fora- MG**

**2013**

FONTES, Livia Beatriz Almeida Fontes

Avaliação dos efeitos da Licochalcona A e do *trans*-cariofileno sobre a encefalomielite autoimune experimental (EAE)

Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

Nº de pags.127

Orientador: José Otávio do Amaral Corrêa

Dissertação de Mestrado

1.Esclerose Múltipla 2.Encefaliomelite autoimune experimental 3.Licochalcona A  
4. *Trans*-cariofileno 5.Imunomodulação

I. Universidade Federal de Juiz de Fora

II. Avaliação do Potencial Imunomodulador da Licochalcona A e do *trans*-cariofileno

**Avaliação dos efeitos da Licochalcona A e do *trans*-cariofileno  
sobre a encefalomielite autoimune experimental (EAE)**

**Lívia Beatriz Almeida Fontes**

Dissertação de Mestrado 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 \_\_\_\_/\_\_\_\_/2013

---

Prof. Dr. João Paulo Viana Leite

---

Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

---

Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho- Co-Orientador

---

Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa - Orientador

“Tantas vezes pensamos ter chegado,  
tantas vezes é preciso ir além”.

**Fernando Pessoa.**

**Dedico esse trabalho a minha família  
que me ensinou que sem educação,  
serenidade e disciplina não se chega  
a lugar algum.**

## AGRADECIMENTOS

Durante esse dois anos, só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a Deus, dono de todo conhecimento e sabedoria, por iluminar meus passos e me conceder essa conquista, por estender suas mãos nos momentos de desânimo e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho, principalmente no decorrer do mestrado.

Aos meus pais que, por vezes, renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus e aos meus irmãos pelo estímulo e carinho.

Ao meu orientador Dr. José Otávio do Amaral Corrêa, por tudo e mais um pouco. Por acreditar que eu era capaz, pela orientação e por sempre estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos, orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação em cada detalhe deste trabalho. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspiração para me tornar melhor em tudo faço e irei fazer daqui para frente. Tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada.

Ao meu co-orientador Dr. Ademar Alves da Silva Filho pela paciência, disponibilidade e conhecimento transmitido, indispensáveis à concretização deste trabalho. Agradeço-o ainda por me mostrar que não existem limites para se obter conhecimento.

A Dra. Beatriz Julião Aarestrup pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos, por ter sido tão presente num momento muito especial na construção deste trabalho, por meio de seus ensinamentos e sugestões, tendo participado de forma determinante para que ele acontecesse.

Agradeço também ao Dr. Fernando Monteiro Aarestrup e a Dra. Priscila de Faria Pinto que com suas dicas na minha qualificação, acrescentaram de maneira imprescindível mais conhecimento ao meu trabalho.

Agradeço as alunas de iniciação científica Débora Dias e Lívia Reis, companheiras de todas as horas, essenciais para o desenvolvimento e execução dos experimentos laboratoriais, por toda ajuda e conversa amiga.

Aos meus colegas de pós-graduação pela divisão de conhecimentos, e em especial as minhas “carrapatas” Michele e Kamilla, companheiras dos intermináveis finais de semana de estudo. Por todo auxílio em momentos que eu achei que não conseguiria, vocês são pessoas iluminadas com quem quero ter contato por toda a vida.

Agradeço ao Msc. Harleson Lopes de Mesquita por dispor de seu tempo, sempre com boa vontade, pelo apoio e colaboração.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora: Caio Alves, Sandra Castro e Marcilene Evangelista por toda a orientação inicial nos experimentos do projeto, e em especial a Alyria Dias, pelo grande auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos alunos do laboratório NIPPAN, por toda ajuda.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e pelo acolhimento.

As minhas amigas pelo apoio incondicional e compreensão, principalmente nos meus momentos de maiores apuros e involuntárias ausências.

Agradeço à FAPEMIG e à CAPES pelo apoio financeiro;

Agradeço, enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para que eu realizasse esse trabalho. Muito obrigada!



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1	ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM).....	27
2.2	ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL(EAE).....	32
2.3	IMUNOPATOLOGIA DA EM E DA EAE.....	35
2.4	TRATAMENTOS PARA ESCLEROSO MÚLTIPLA.....	39
2.5	PRODUTOS NATURAIS COMO PROTÓTIPOS PARA NOVOS FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E IMUNOMODULADORES.....	44
2.5.1	Raiz de alcaçuz e a Licochalcona A.....	46
2.5.2	Óleo de Copaíba e o <i>trans</i> -cariofileno.....	51
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	55
4.2	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA A OBTENÇÃO DA LICO A.....	55
4.2.1	INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA.....	55
4.2.2	MATERIAIS CROMATOGRÁFICOS.....	55
4.2.3	Obtenção do Espectro de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.....	56
4.3	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LICO A.....	57
4.4	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	60
4.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	60
4.6	INDUÇÃO DA EAE.....	61
4.7	TRATAMENTO APÓS A INDUÇÃO DE EAE.....	61
4.8	AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS.....	62
4.9	AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PESO.....	63
4.10	OBTENÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS, ESPLÊNOCITOS E TECIDO NERVOSO CENTRAL.....	63

4.10.1	Obtenção das células do exudato peritoneal.....	63
4.10.2	Obtenção dos esplenócitos.....	64
4.10.3	Preparo do material do SNC.....	64
4.11	<b>COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS.....</b>	<b>65</b>
4.11.1	Hematoxilina e Eosina (Luna, 1968; Carvalho, 1999).....	65
4.12	<b>ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA.....</b>	<b>66</b>
4.13	<b>PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO).....</b>	<b>66</b>
4.14	<b>PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>67</b>
4.15	<b>DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA.....</b>	<b>67</b>
4.16	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
5.1	<b>OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LICO A.....</b>	<b>70</b>
5.2	<b>CURSO CLÍNICO DA EAE.....</b>	<b>73</b>
5.3	<b>ACOMPANHAMENTO DO PESO.....</b>	<b>79</b>
5.4	<b>PRODUÇÃO DE NO.....</b>	<b>82</b>
5.5	<b>PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>84</b>
5.6	<b>AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE ESPLÊNOCITOS DOS CAMUNDONGOS C57BL/6 INDUZIDOS DA EAE E TRATADOS COM A LICO A E O <i>TRANS</i>-CARIOFILENO.....</b>	<b>86</b>
5.6.1	Interferon-gama.....	86
5.6.2	Fator de Necrose Tumoral-alfa.....	88
5.6.3	Interleucina 17.....	90
5.7	<b>ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE AMOSTRAS DO SNC PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM LICO A E <i>TRANS</i>-CARIOFILENO.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>114</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>116</b>
	<b>ANEXO- Protocolo N° 039/2010.....</b>	<b>128</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Prevalência da esclerose múltipla no mundo.....	<b>21</b>
<b>Figura 2</b>	Evolução das formas clínicas de EM.....	<b>31</b>
<b>Figura 3</b>	Raiz de alcaçuz.....	<b>46</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura química da Lico A.....	<b>47</b>
<b>Figura 5</b>	Estrutura química do <i>trans</i> -cariofileno.....	<b>52</b>
<b>Figura 6</b>	Fluxograma do procedimento de fracionamento do extrato seco de raiz de alcaçuz ( <i>Glycyrrhiza inflata</i> ) para a obtenção da Lico A.....	<b>59</b>
<b>Figura 7</b>	Estrutura química da Lico A com numeração das funções orgânicas para confirmadas por RMN.....	<b>70</b>
<b>Figura 8</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto Lico A (CD <sub>3</sub> OD, 300MHz).....	<b>71</b>
<b>Figura 9</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do composto Lico A (CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz).....	<b>72</b>
<b>Figura 10</b>	Cinética da avaliação do efeito da Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e do <i>trans</i> -cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) sobre a média dos escore clínicos em camundongos C57BL/6 com a EAE 20 dias pós indução.....	<b>78</b>
<b>Figura 11</b>	Avaliação do efeito da Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e do <i>trans</i> -cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na variação de peso em camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.....	<b>81</b>
<b>Figura 12</b>	Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o <i>trans</i> -cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de NO em sobrenadante de culturas de células peritoneais de camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.....	<b>83</b>
<b>Figura 13</b>	Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o <i>trans</i> -cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em sobrenadante de culturas de células peritoneais	

	camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.....	<b>85</b>
<b>Figura 14</b>	Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o <i>trans</i> -cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.....	<b>87</b>
<b>Figura 15</b>	Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o <i>trans</i> -cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de TNF- $\alpha$ em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.....	<b>89</b>
<b>Figura 16</b>	Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o <i>trans</i> -cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de IL-17 em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.....	<b>91</b>
<b>Figura 17</b>	Cortes histológicos de medula espinhal de camundongos C57BL/6. Coloração HE. Aumento original 400x.....	<b>95</b>
<b>Figura 18</b>	Cortes histológicos de cérebro de camundongos C57BL/6. Coloração HE. Aumento original 400x.....	<b>97</b>
<b>Figura 19</b>	Cortes histológicos de cerebelo de camundongos C57BL/6. Coloração HE. Aumento original 400x.....	<b>99</b>

**LISTA DE QUADROS E TABELAS**

<b>Quadro 1</b>	Modelos de EAE ativa comumente utilizados e suas aplicações.....	<b>34</b>
<b>Tabela 1</b>	Dados apresentados na literatura sobre o possível efeito imunomodulatório da Lico A.....	<b>50</b>
<b>Tabela 2</b>	Dados apresentados na literatura sobre o possível efeito imunomodulatório do <i>trans</i> -cariofileno.....	<b>53</b>
<b>Tabela 3</b>	Grupo de frações obtidas por CLV do extrato seco (15g) da raiz de alcaçuz (GI).....	<b>57</b>
<b>Tabela 4</b>	Grupos de frações obtidas por CLV da fração GI.V (10,5g).....	<b>58</b>
<b>Tabela 5</b>	Escore clínico dos C57BL/6 com EAE.....	<b>62</b>
<b>Tabela 6</b>	Média dos escores encontrados nos grupos do experimento no 19° e 20° dia pós indução de EAE.....	<b>74</b>

**LISTA DE ABREVEATURAS**

AcOEt	- Acetato de etila
BHE	- Barreira hematoencefálica
CCDC	- Cromatografia em camada delgada comparativa
CFA	- Adjuvante Completo de Freud
C Flash	- Cromatografia “Flash”
CLV	- Cromatografia líquida a vácuo
COX-2	- Ciclo-oxigenase-2
CV	- <i>Cordia verbenacea</i>
DA	- Dermatite atópica
DZ	- Dizigóticos
DCM	- Diclorometano
EAE	- Encefalomielite autoimune experimental
EBV	- Vírus Epstein-Barr
ELISA	- Ensaio imunoenzimático
EM	- Esclerose múltipla
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
EtOH	- Etanol
FDA	- Food and Drug Administration
FoxP3	-Fator de transcrição envolvido em respostas imunitária adquirida
GATA	-Fator de transcrição
GI	- <i>Glycyrrhiza inflata</i>
HE	- Hematoxilina e eosina
HEX	-Hexano
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
ICAM	- Molécula de adesão intracelular
VCAM	- Molécula de adesão vascular
IL	- Interleucina
KO	- Nocaute
iNOS	- Óxido nítrico-sintase induzível
INF-β	- Interferon beta

INF- $\gamma$	- Interferon gama
Lico A	- Licochalcona A
LPS	- Lipopolissacarídeo
MCP-1	- Proteína quimiotática de monócitos-1
MeOH	- Metanol
MOG	- Glicoproteína associada ao oligodendrócito
MZ	- Monozigótico
NaOH	- Hidróxido de sódio
NF-kB	- Fator nuclear <i>kappa</i> B
NO	- Óxido nítrico
PBM	- Proteína básica de mielina
PLP	- Proteolipídeo da mielina
PBS	- Salina tamponada com fosfato
PBS-T	- Salina tamponada com fosfato e Tween 20
RMN	- Ressonância magnética nuclear
ROR $\gamma$ t	- Fator de transcrição envolvido em resposta imunitária adquirida
SNC	- Sistema nervoso central
STAT	- Gene transdutor de sinal e ativador da transcrição
T-bet	- Fator de transcrição
TGF- $\beta$	- Fator estimulante de colônia de granulócitos beta (transforming growth factor)
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor-alpha)

FONTES, L. B. A. Avaliação dos efeitos da Licochalcona A e do *trans*-cariofileno sobre a encefalomielite autoimune experimental (EAE). 2013. 127p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

## RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, crônica, progressiva, inflamatória e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). Devido à similaridade clínica e histopatológica com esta doença, a encefalomielite autoimune experimental (EAE) apresenta um modelo clínico experimental amplamente aceito da EM, devido ao fato de ambos terem processos fisiopatológicos mediados por células Th1 e citocinas pró-inflamatórias, como Interferon-gama (INF- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e, mais recentemente, células Th17, produtores principalmente de IL-17, e radicais oxigenados, como NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzidos principalmente por células fagocitárias. Os medicamentos hoje utilizados para a EM atuam sobre esses mediadores inflamatórios, porém, apresentam inconvenientes como, custo elevado e/ou efeitos adversos pronunciados. Devido a isso, a pesquisa por novas drogas para o tratamento da EM, concentra-se em substâncias que sejam capazes de modular a produção desses mediadores inflamatórios com maiores vantagens para o paciente. No presente estudo a EAE foi induzida em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com a MOG<sub>35-55</sub> e os animais foram tratados com a Licochalcona A (isolado e purificado a partir da *Glycyrrhiza inflata*) em doses de 15 e 30 mg/kg/dia e com o *trans*-cariofileno (obtido comercialmente em doses de 25 e 50 mg/kg/dia por gavagem (via oral) a partir do 10º dia até o pico dos sintomas clínicos da doença. Para verificar o efeito deste tratamento os seguintes parâmetros foram utilizados: avaliação clínica dos animais, realizada diariamente através da pesagem e pontuação dos escores neurológicos; análise histopatológica por hematoxilina e eosina do tecido cerebral e medula espinhal; produção de NO, avaliada pelo método de Griess; produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pelo método de Pick & Mizel, ambos em cultura de células peritoneais; níveis de IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$ , quantificados por ELISA no sobrenadante de cultura de esplenócitos. O resultados mostraram que tanto a Licochalcona A, como principalmente o *trans*-cariofileno nas maiores doses administradas causaram



redução significativa na neuroinflamação e desmielinização no SNC. Os níveis de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$  também apresentaram acentuada redução estando correlacionados com a melhoria dos sintomas clínicos. Os resultados sugerem que a Licochalcona A e o *trans*-cariofileno podem modular a produção de mediadores inflamatórios, interferindo sobre a patogênese da EAE. Tais substâncias podem ser instrumentos importantes para o tratamento de doenças desmielinizantes inflamatórias do SNC, tais como a EAE, o modelo clínico experimental mais utilizado para a esclerose múltipla.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla; Encefalomielite Autoimune Experimental; Imunomoduladores ; Produtos Naturais; Neuroimunologia.

FONTES, L. B. A. Evaluation of the effects of Licochalcone A and *trans*-caryophyllene on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). 2013. 127p. Dissertation (Master of Pharmaceutical Sciences). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

### ABSTRACT

The multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) with features to be chronic, progressive, inflammatory and demyelinating. Due to the clinical and histopathological similarity with experimental autoimmune encephalomyelitis disease (EAE) this became a widely accepted study animal model of MS because both have pathophysiological processes involving Th1 cells and soluble pro-inflammatory cytokines such as Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and more recently Th17 cells, primarily producers of IL-17, oxygen free radicals as NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by phagocytic cells. Drugs currently used in fact act on these inflammatory markers but have many disadvantages such as high cost and/or pronounced adverse effects. Due to that, the search for new drugs to treat MS focuses on substances that are able to modulate the production of these inflammatory mediators with greater advantages to the patient. In the present study EAE was induced in female mice C57BL6 lineage with the MOG<sub>35-55</sub> and the animals were treated with Licochalcone A (isolated and purified from *Glycyrrhiza Inflata*) in doses 15 and 30 mg/Kg/dia and with *trans*-caryophyllene (obtained commercially in doses of 25 and 50 mg/Kg/dia by gavage (oral administration) from day 10° until the peak of the clinical symptoms of the disease. To verify the effect of this treatment the following parameters were used: clinical evaluation, was made by a neurological score of symptoms and weighing; histopathological analysis, for hematoxylin and eosin staining of the brain and spinal cord tissue at the end of the experiment; production of NO, evaluated by Griess method; production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; by Pick Mizel, both in culture of peritoneal cells; quantification of IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$  was made by ELISA on the surface of spleen cells culture. Both Licochalcone A, as mainly the *trans*-caryophyllene in higher doses caused significant reduction in neuroinflamação and demyelination in the CNS. The levels of NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$  also

showed sharp reduction being correlated with the improvement of clinical symptoms. The results suggest that the Licochalcone A and trans-caryophyllene can modulate the production of inflammatory mediators, interfering on the pathogenesis of EAE. Such substances may be important instruments for treatment of CNS demyelinating inflammatory diseases such as EAE, animal model more used for multiple sclerosis.

Keywords: Multiple Sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; Immunomodulators; Natural Products; Neuroimmunology.

## 1 INTRODUÇÃO

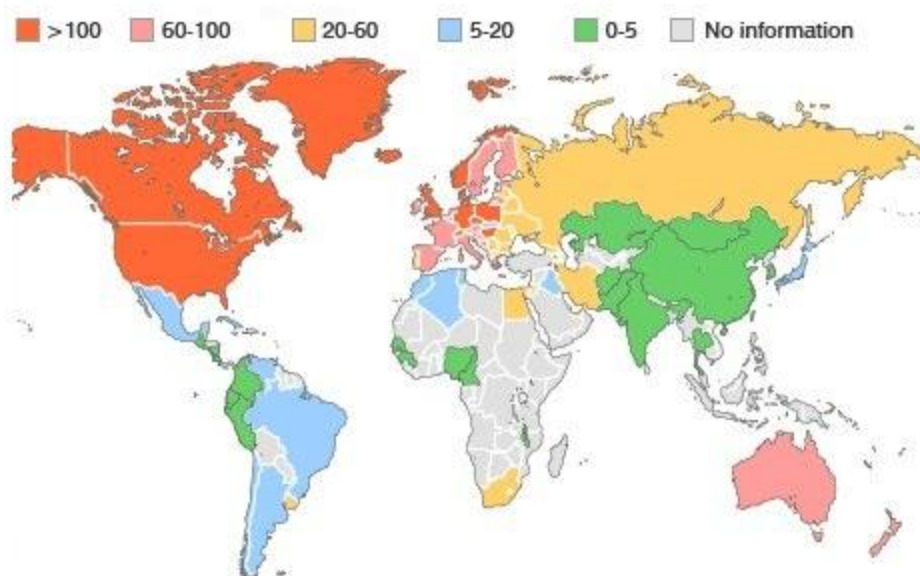
A Esclerose múltipla (EM) é uma doença de evolução crônica e progressiva, mediada por um mecanismo imunológico que acomete o sistema nervoso central (SNC), sendo caracterizada por processo inflamatório que leva a desmielinização, gliose e subsequente dano axonal. É considerada uma resposta autoimune mediada por células T contra antígenos da mielina, levando a um posterior processo neurodegenerativo (SOSPEDRA et. al., 2005; FLETCHER et. al., 2010; KAKALACHEVA, LUNEMANN, 2011; ELLIOTT et. al.; 2012; MURTA, FERRARI, 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 a 93% e sua importância é, claramente evidenciada, pela relação entre o grau de perda axonal e a incapacidade neurológica observada entre os pacientes com EM (LUDWIN, 2006; WALKER et. al., 2011; MURTA, FERRARI, 2013).

Em seu início, a doença pode ser clinicamente caracterizada por períodos de surtos e remissão, observados em aproximadamente 85% a 90% dos pacientes. Sendo que, eventualmente, as lesões geradas nos surtos podem se tornar permanentes, levando então, a um curso clínico classificado como fase secundária e progressiva. Neste quadro a área de neurodegeneração é menos sensível aos tratamentos que são utilizados no início da doença, como por exemplo, os anti-inflamatórios (KERSCHENSTEINER et. al., 2004; BRUCK 2005; MORRIS, YIANNIKAS, 2012; SHEREMATA, TORNES, 2013).

A EM afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo, porém no Brasil, não existem muitos estudos de prevalência. O número de casos registrados é, em média, de 15 casos para cada 100.000 habitantes na região sudeste. Porém existem regiões onde o número de casos é inferior a 5 casos/100.000 habitantes (FINKELSZTEJN et. al., 2009; RIBEIRO et. al., 2011; LANA-PEIXOTO et. al., 2012c; MARRIE et. al., 2013; OJEDA, 2013).

Com isso, a doença parece ter prevalência média na América do Sul em comparação com países do Hemisfério Norte, como na América do norte, Austrália e norte da Europa, onde a incidência chega a 1 caso a cada 1000 habitantes. Apesar de 10% dos pacientes serem diagnosticados antes dos 16 anos, a doença ocorre predominantemente em mulheres caucasianas, com faixa etária de 20 a 40 anos, sendo por isso, uma importante causa de incapacitação e de grande impacto socio-econômico nos países desenvolvidos (COMPSTON, COLES, 2002; SILVA et. al., 2008a; LANA-PEIXOTO, 2008b; CORRÊA et. al., 2010; OJEDA, 2013).



**Figura 1.** Prevalência da esclerose múltipla no mundo  
(por 100.000 habitantes)

Fonte: [www.neurology.ucsf.edu](http://www.neurology.ucsf.edu) (2012).

Os sintomas são variados e incluem: fraqueza muscular e de extremidades, ataxia, espasticidade, fadiga debilitante, vertigem, comprometimento visual, comprometimento cognitivo, disfunção do intestino e da bexiga, além de problemas emocionais e sexuais, podendo levar ao óbito (AKKUS et. al., 2011; BOL et. al., 2012). Contudo, de acordo com a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM, 2012) não existe um padrão sintomático definido como o ideal para a EM. Cada paciente possui um tipo de manifestação da doença já que os sintomas estão relacionados com o comprometimento da mielina e/ou axônios, característica essa, que varia de um indivíduo para outro.

O diagnóstico precoce ainda é difícil e na ausência de uma prova imunológica específica os critérios para diagnóstico da EM são baseados na anamnese, no exame físico do paciente, na análise do líquido cefalorraquidiano, por imagem de ressonância magnética, por dosagem de anticorpos e por estudos eletrofisiológicos (LEITE et. al., 2009; MARRIE et. al., 2013).

Inicialmente, acreditava-se que na EM as citocinas produzidas pela resposta imunológica contra o SNC tinham um padrão específico do tipo T-helper 1 (Th1), como interleucina-12 (IL-12) e Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), sendo as principais citocinas envolvidas na indução do processo inflamatório durante o curso da EM. Entretanto, hoje se sabe da importância da resposta específica mediado por linfócitos T com um padrão Th17, já que o rompimento da barreira hematoencefálica acontece, entre outros fatores, por ação da IL-17, citocina produzida por este tipo celular. Porém, cabe ressaltar que, as citocinas pró-inflamatórias e mediadoras tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), 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 (BETTELLI et. al., 2006; VELDHOEN et. al., 2006; YANYING et. al., 2007; De PAULA et. al., 2008; FLETCHER et. al., 2010; CORRÊA et. al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013).

A limitação de estudos em humanos, a dificuldade do acesso ao tecido lesado (SNC) e a rara realização de autópsias são as principais causas da utilização de modelos animais para os estudos da EM (DENIC et. al., 2010). Muito do que se sabe hoje sobre a resposta imunológica e tratamentos na EM é devido a estudos desenvolvidos em modelos experimentais com animais. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é uma doença desmielinizante do SNC, amplamente aceita como modelo clínico experimental da EM por apresentar similaridade clínica, morfológica e histopatológica com a doença. Com isso, a EAE passou a ser considerada como modelo amplamente aceito de estudos dos mecanismos imunopatológicos não só em EM, mas de doenças inflamatórias, desmielinizantes e de origem autoimune do SNC (MIX, et. al.; 2008a; CORRÊA et. al., 2010; FLETCHER et. al., 2010; CHASTAIN et. al., 2011; ELLIOT et. al., 2012).

A EAE pode ser induzida em animais geneticamente susceptíveis pela imunização com antígenos de mielina emulsificados em adjuvante apropriado, sendo a resposta mediada por células T mielinas-específicas, que são ativadas na periferia e se deslocam até o SNC, onde ocorre a permeabilização da barreira hematoencefálica pelas células T ativadas (FLETCHER et. al., 2010; CHASTAIN et. al., 2011).

Este modelo animal também pode ser induzido pela transferência adotiva de células T CD4<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).

Como mencionado, atualmente os modelos experimentais tem sido de grande valia, já que de acordo com o do protocolo de imunização e animal escolhido, a EAE pode se apresentar como doença aguda, crônica de curso progressivo ou recorrente-remitente. Sendo então importante para o desenvolvimento de novas terapias contra EM, como ocorreu com o Acetato de glatiramer e o Natalizumab (FLETCHER et. al., 2010).

Como em outras doenças autoimunes, ainda não existe uma cura para EM. As terapias atualmente disponíveis são destinadas principalmente a redução do número de recidivas e objetivam retardar a progressão da doença. E por acreditar que o processo inflamatório é o responsável pela desmielinização e neurodegeneração, drogas anti-inflamatórias e imunomodulatórias são amplamente utilizadas (CORRÊA et. al., 2010; LASSMANN, 2011).

Os primeiros tratamentos tinham como base os glicocorticoides, que até hoje são usados para acelerar o processo de recuperação pós-surto. Entretanto apresentam uma série de efeitos adversos quando usados em altas doses e por longos períodos de tratamento. Com isso, a busca de novas alternativas terapêuticas se faz necessária (TILBERY, 2005; VIRLEY, 2005; CORRÊA et. al., 2010; BISAGA, et. al., 2012).

Pelo exposto acima, as terapias imunomodulatórias surgiram promissoras para o tratamento, substituindo quando possível, o uso dos glicocorticóides. As drogas imunomoduladoras como Interferon (IFN- $\beta$ ) e o Acetato glatiramer, são as mais utilizadas. No entanto, são pouco eficazes como primeira linha de tratamento. Um terço de doentes com EM apresentam o tipo clínico remitante-

recorrente, que é o tipo mais comum, nesses casos, estas drogas são pouco efetivas, pois os pacientes acabam por desenvolver re-incidências e/ou piora das deficiências (FLETCHER et. al., 2010; MIX et. al., 2010b; MORRIS, YIANNIKAS 2012). Além do fato das terapias imunomodulatórias apresentarem vários efeitos adversos, os custos são extremamente elevados e nem todos os pacientes são responsivos a elas (CORRÊA et. al., 2010; BERTO, et. al. 2011).

Com isso, a busca por tratamentos mais seguros, eficazes e mais baratos se torna necessária. Uma das possíveis fontes de tratamento poderá vir dos produtos naturais e, especialmente das plantas medicinais, que possuem grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos empregados na medicina humana (ALEXANDRE et. al., 2008; MISHRA, TIWARI, 2011; NEWMAN, CRAGG, 2012).

Com relação às plantas medicinais, estas representam uma valiosa alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos. Exemplos de fármacos obtidos de plantas são a digoxina (obtida de *Digitalis* sp.), utilizada em insuficiência cardíaca, o taxol (obtido de *Taxus brevifolia*), usado como antitumoral e a morfina (obtida da *Papaver somniferum*) um potente analgésico (PUPO, GALLO, 2007; BARREIRO, 2009; COSTA, 2009). Neste contexto, vários fármacos já foram obtidos a partir de precursores naturais para diversas patologias, inclusive para o tratamento de EM (NEWMAN, CRAGG, 2012), como no caso do Fingolimod que teve como protótipo um produto natural (obtido do fungo *Isaria sinclairii*) (CHIBA, ADACHI, 2012).

Deste modo, as plantas medicinais constituem importante fonte de substâncias químicas para o desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente para aqueles com propriedades anti-inflamatórias úteis na modulação do sistema imune (CARVALHO, 2004a; NABAS et. al., 2009). A imunomodulação pode ser exercida mediante a potencialização ou por meio da suspensão de elementos do sistema imunológico. Apesar da maioria dos imunomoduladores surgirem de maneira empírica, recentemente, com o desenvolvimento da compreensão da fisiopatologia do sistema imune, novos imunomoduladores mais efetivos e seguros podem ser desenvolvidos (PROVENZA, VILLALBA, 2010).



Neste sentido, vários estudos têm sido conduzidos na busca de substâncias capazes de modular o sistema imune (CARVALHO et. al., 2005b, COUTINHO et. al., 2009, NUALKAEW et. al., 2009). Diante do exposto, vê-se a importância de se incrementar as pesquisas com plantas medicinais e suas substâncias ativas envolvendo maior associação entre a química e a farmacologia, pois é por meio desta que novos fármacos poderão ser descobertos (RODRIGUES et. al., 2010).

Dentre os vários compostos naturais ativos com potencial farmacológico para o tratamento da EM, destacamos a Licochalcona A (Lico A) e o *trans*-cariofileno. Essas substâncias têm demonstrado grande potencial imunomodulatório, inibindo a produção de mediadores presentes em processos inflamatórios e que inclusive estão presentes na EM, sendo substâncias promissoras para os experimentos em EAE (BARFOD et. al. 2002; KOLBE et. al., 2006; ZHOU, et. al., 2007; CHO et. al., 2007; FERNANDES et. al., 2007; VEIGA JR et. al., 2007; FURUSAWA, et. al., 2009; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2010c).

A Lico A é a principal chalcona encontrada nas raízes de alcaçuz (*Glycyrrhiza sp*), as quais são usadas popularmente para o tratamento de doenças inflamatórias (FURUSAWA, et. al., 2009, FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2009b). Trabalhos demonstram efeitos anti-inflamatório e imunomoduladores da Lico A, a qual é capaz de inibir citocinas e radicais livres que estão presentes tanto na imunopatogênese da EAE como da EM. Assim, estudos mostram que a Lico A inibe a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e diminui a indução da *i*NOS (enzima envolvida na produção de óxido nítrico - NO), além de ser capaz de inibir a ativação de STAT-3 (fator de transcrição para a diferenciação de Th17). (BARFOD et. al. 2002; KOLBE et. al., 2006; ZHOU, et. al., 2007; WEI, et. al., 2007; FURUSAWA, et. al., 2009; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2010c).

Assim como a Lico A, o *trans*-cariofileno possui ação anti-inflamatória e imunomodulatória (CHO et. al., 2007; FERNANDES et. al., 2007; MEDEIROS et. al., 2007; VEIGA JR et. al., 2007), apresentando grande potencial no tratamento da EM. O *trans*-cariofileno é um sesquiterpeno também encontrado em diversas plantas medicinais brasileiras, especialmente naquelas do gênero *Copaifera*. A copaíba (gênero *Copaifera* L., família Leguminosae Juss., sub-família

Caesalpinoideae Kunth) é uma árvore nativa do Brasil da qual se extrai um óleo-resina do tronco, conhecido como óleo de copaíba. Este óleo, que apresenta como principal substância química o sesquiterpeno *trans*-cariofileno, possui grande interesse medicinal, sendo utilizado principalmente por suas propriedades analgésica e anti-inflamatória (FERNANDES et. al., 2007; YAMAGUICHI, GARCIA, 2012).

Com relação às atividades anti-inflamatórias do *trans*-cariofileno, estudos relatam que esta substância reduz a produção de INF- $\gamma$ , COX-2, *i*NOS e TNF- $\alpha$ , sendo também tanto capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida por lipopolissacárideos (LPS) quanto de promover a redução dos níveis de mieloperoxidase, INF- $\gamma$  e IL-6 (CHO et. al., 2007; FERNANDES et. al., 2007; MEDEIROS et. al., 2007; VEIGA JR et. al., 2007).

Desta forma, considerando as atividades anti-inflamatórias e imunomodulatórias da Lico A e do *trans*-cariofileno e o grande potencial destas substâncias no tratamento de doenças autoimunes, faz-se necessária a avaliação do efeito imunomodulatório destes compostos no curso clínico, aspectos histológicos e produção de mediadores inflamatórios na patogênese da EAE em camundongos C57BL/6.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESCLEROSE MULTIPLA (EM)

A EM é uma doença crônica, inflamatória e progressiva que envolve o cérebro e a medula espinhal, resultante de uma resposta autoimune contra antígenos da mielina. Hipóteses sugerem que a doença é inicialmente mediada por células T com posterior processo neurodegenerativo. Os linfócitos T autorreativos migram através da barreira hematoencefálica (BHE) e promovem danos, em particular contra os neurônios centrais e suas bainhas de mielina, mas também podem causar lesões nos axônios (FLECTHER et. al., 2010; ELLIOTT et. al., 2012; MURTA, FERRARI, 2013).

Sendo que, o ponto chave e característico morfológicamente da EM é a desmielinização primária dos axônios, que levam ao bloqueio total ou parcial dos sinais de condução. A manifestação neurológica aparece quando o bloqueio da condução acomete uma porção significativa de fibras, que de acordo com estudos imunopatológicos podem estar presentes em diferentes locais. Com isso, os quadros clínicos podem variar em cada indivíduo (FLECTHER et. al., 2010; ELLIOTT et. al., 2012; MURTA, FERRARI, 2013).

Nas últimas décadas, um grande número de estudos demonstraram a frequência de EM nos continentes. Porém, na América Latina, as pesquisas sobre a epidemiologia da EM ainda são escassos. A prevalência da EM varia consideravelmente em todo o mundo, sendo maior nas regiões situadas entre os paralelos 44 e 64 Norte. Áreas consideradas de alta prevalência são aquelas com mais de 30 casos por 100.000 habitantes, áreas de prevalência média com 5 a 30/100.000, e áreas de baixa prevalência, com casos inferiores a 5/100.000 habitantes (RIBEIRO et. al., 2011; LANA-PEIXOTO et. al., 2012c; HUYNH, CASACCIA, 2013; OJEDA, 2013).

O interesse pelo estudo da EM no Brasil aumentou acentuadamente nos últimos anos. Estudo realizado por CALLEGARO et. al. (2001), na cidade de São Paulo, em 1990 mostrou uma taxa de prevalência de 4,3 por 100.000

habitantes. Uma re-avaliação desta taxa de prevalência, pelo mesmo autor em 1997, após uma averiguação mais completa dos casos, encontrou-se taxa de prevalência de 15 casos por 100.000 habitantes. Já em um terceiro estudo realizado na cidade de Botucatu, localizada a 150 km de São Paulo, revelou taxa de prevalência de 17/100.000 habitantes. Em Belo Horizonte e Uberaba, cidades localizadas no Estado de Minas Gerais, as taxas de prevalências encontradas foram de 18,1/100.000 habitantes e 12,5/100.000, respectivamente, em estudo realizado por RIBEIRO et. al. (2011).

Contudo, em estados como o Recife, a taxa observada é de 1,36 casos/100.000 habitantes. Esses dados demonstram que a grande extensão territorial e diversidade climática brasileira, além da diversidade étnica encontrada na população, são fatores relevantes no quando se trata da prevalência da doença (FINKELSZTEJN et. al., 2009; LANA-PEIXOTO et. al., 2012c).

A EM pode afetar todas as porções do SNC e as lesões causam ao portador sintomas de disfunção neural como manifestações motoras, sensoriais, cerebelares, autonômicas, psiquiátricas e anormalidade nos nervos cranianos (SOSPEDRA et. al., 2005; CORRÊA et. al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013). Assim como em outras doenças autoimunes mediadas por linfócitos T, os genes do Complexo Histocompatibilidade Principal estão relacionados com EM. Sendo que, os genes que conferem um maior risco para o desenvolvimento da doença são os dos tipos HLA-DR e o DQ (SILVA et. al., 2008a; KAKALACHEVA, LUNEMANN, 2011).

Porém de acordo com MIX et. al. (2010b), outros genes também oferecem risco no desenvolvimento da EM, sendo eles os: EV15, CD58, KIF1B, RGS1 e RPL5 (localizado no cromossomo 1); IL-12 (localizado no cromossomo 3); PTGER4 (localizado no cromossomo 5); OLIG3-TNFAIP3 (localizado no cromossomo 6); CD6 (localizado no cromossomo 11); TNFRSF1A (localizado no cromossomo 12); IRF8 e CLEC16A (no cromossomo 16); CD226 (no cromossomo 18); e TYK2 (no cromossomo 19).

A influência genética na susceptibilidade à EM é também sugerida pelo fato de que a taxa de concordância da doença em gêmeos monozigóticos (MZ) é cinco vezes maior que entre os gêmeos dizigóticos (DZ). Esta se aproxima da

de parentes em paciente afetados pela doença. Em um estudo realizado no Canadá com a participação de gêmeos, foram encontrados entre os indivíduos portadores de EM, 25,3% sendo gêmeos MZ, 5,4% eram DZ e entre irmãos não-gêmeos de 2,9%. Esse estudo também levou em conta estudos anteriores, e revelou que, em geral, as taxas de concordância são significativamente maiores entre os MZ do sexo feminino, em comparação com gêmeos MZ do sexo masculino (BOGDANOS et. al., 2012; SONG, GWAN, 2013).

Apesar do caráter genético, a etiologia da EM ainda é desconhecida, contudo admite-se que se trata de uma doença com etiologia multifatorial, que ocorre em indivíduos geneticamente predispostos, e que após a exposição a um estímulo ambiental ocorre ativação das células, sendo sobre tudo de natureza autoimune (KAKALACHEVA, LUNEMANN, 2011; SONG, GWAN, 2013).

Entretanto, a hipótese de que a origem seja infecciosa foi muito pesquisada ao longo dos anos e ainda nos dias de hoje não é uma hipótese descartada. Entre os agentes infecciosos, os vírus são os mais relacionados, e por isso, os mais pesquisados. São eles: o vírus herpes humano 6, vírus de Epstein-Barr (EBV), vírus do sarampo e os retrovírus. Atualmente, evidências indicam que a infecção com EBV tem um papel importante na patogênese da EM. Existindo então, a possibilidade de que a infecção por esse vírus no cérebro impulse o desenvolvimento de EM. Fato esse que tem profundas implicações para a prevenção e tratamento. Contudo mais estudos são necessários para que essa relação seja concretizada (PENDER, 2012).

Outra hipótese etiológica e mais aceita é a autoimune, onde o processo de desmielinização seria iniciado pela ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> periféricos com reatividade a mielina. Mas, o que ocorre nesta hipótese é que o motivo pelo qual o linfócito T CD4<sup>+</sup> é ativado é desconhecido. O SNC normalmente possui uma proteção a infiltrados celulares pela BHE, pela barreira hematoquímica e pelas meninges. No entanto, as células T ativadas e de memória são capazes de penetrar no SNC pelo fato de expressarem moléculas de adesão, receptores de quimiocinas e integrinas que lhes permitem passar pelas barreiras (PETERMANN et. al., 2011; MURTA, FERRARI, 2013).

De acordo com SANTOS et. al. (2005), os autoantígenos reativos das proteínas da bainha de mielina, em especial a Proteína básica da Mielina (PBM) e glicoproteína olidendrócito da mielina (MOG), são apresentados pelos macrófagos as células T DC4<sup>+</sup> desencadeando o processo que dará origem a lesão e ou mesmo a destruição da mielina.

Entretanto, cabe ressaltar que essas duas hipóteses (viral e autoimune) parecem ser complementares, tendo em vista que, em experimentos realizados em modelos animais, os dois tipos de indução da doença levaram a degeneração axonal. Degeneração essa, que é aceita como o principal fator e determinante da incapacidade neurológica irreversível observada em pacientes com EM (GRIGORIADIS, HADJIGEORGIOU, 2006).

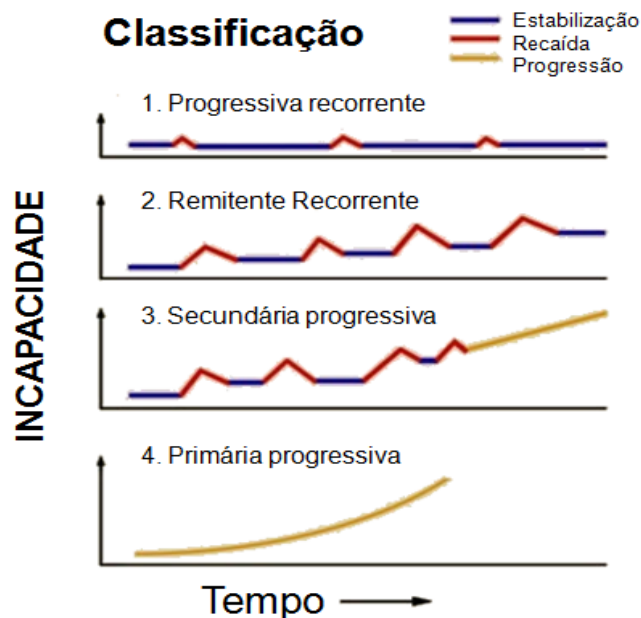
O quadro clínico varia muito, porém em cerca de 85% a 90% dos pacientes o início é caracterizado por surtos e remissões, ou por uma progressão contínua, sendo que os surtos podem durar desde algumas horas a vários dias ou até mesmo semanas e progressivamente vão desaparecendo. São considerados surtos o aparecimento de disfunção neurológica com ausência de quadros febris ou de processos infecciosos num período superior a 24 horas (BRUCK 2005; SILVA et. al., 2008a; MORRIS, YIANNIKAS, 2012).

Devido ao fato da EM apresentar uma grande diversidade no que se diz respeito ao local em que as lesões vão se desenvolver e também quanto a taxa de acúmulo da disfunção (COMPSTON; COLES, 2002), os pacientes foram agrupados por uma rede internacional de acordo com os sintomas e clínica, definindo assim quatro tipos distintos de curso da doença (LUBLIN; REINGOLD, 1996 ) observado, são elas :

A) A Esclerose Múltipla Remitente Recorrente (RR), com surgimento de surtos claramente definidos e é seguida da recuperação total ou parcial dos mesmos, sendo que a cada quadro de surto o paciente pode apresentar sequelas permanentes ou não, com déficit residual após cada recuperação, sendo que os períodos compreendidos entre as recidivas da doença são caracterizadas por uma falta na progressão dos sintomas e é a forma mais comum de manifestação. Ocorrendo, ainda na maioria dos casos, a evolução desses pacientes para uma forma chamada de B) Esclerose Múltipla

Secundária Progressiva (SP) onde ocorre progressão da doença, com ou sem surtos, e pequenos episódios de remissão e estabilização da doença.

Outra forma de evolução da doença é a C) Esclerose Múltipla Primária Progressiva (PP), de evolução lenta e sem a ocorrência de surtos, os sintomas apresentam-se progressivamente com o decorrer da patologia, contudo períodos de estabilização são possíveis. Nesse tipo, os pacientes apresentam um agravamento contínuo e gradual sem a ocorrência de recaídas bem definidas. Ainda temos, a forma D) Progressiva Recorrente (PR), onde não acontecesse uma progressão da doença desde o início, mas ocorrem recaídas agudas claras, com ou sem plena recuperação, e como período entre os surtos mostrando progressão contínua (LUBLIN, 2007).



**Figura 2.** Evolução das formas clínicas de EM.

Fonte: Modificada- [www.sistemanervoso.com](http://www.sistemanervoso.com) (2012).

O conceito de que a EM é uma doença de caráter autoimune mediada por células T CD4<sup>+</sup> se deu pelo estudo no modelo experimental, a EAE. No modelo animal essa evidência é direta, pois a EAE pode ser transferida para animais normais por clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> sensibilizados aos componentes da mielina. Na EM, as evidências são indiretas, mas indicam a importante participação desses linfócitos T autorreativos no desencadeamento da doença. A presença de linfócitos T reativos à mielina e algumas citocinas

foram descritas em indivíduos normais, mas estão aumentados ou ativados no sangue periférico de portadores de EM, principalmente na fase de exacerbação da doença (MIRANDOLA et. al., 2009).

Estudos detectaram uma grande produção espontânea de IL-17 e INF- $\gamma$  a partir de células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes com EM do tipo RR na fase aguda, em até 30 dias após o surto. Já nas formas SP e na fase de remissão da RR, esses níveis não foram encontrados. Sugerindo a relação da IL-17 e do INF- $\gamma$  com a indução da doença (FRISULLO et. al., 2008; MURTA, FERRARI, 2013).

## 2.2 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

A EAE é uma doença inflamatória do SNC, induzida através da imunização ativa ou através da transferência adotiva de células T CD4<sup>+</sup> reativas contra a mielina que apresenta muitos aspectos clínicos, morfológicos e histológicos em comum com a EM humana. Sendo por isso, amplamente utilizada como modelo de doença autoimune órgão específica. A EAE começou a ser estudada por Pasteur após a descoberta da vacina contra raiva, em 1875. Onde o tratamento consistia em inocular o vírus cultivado no sistema nervoso central de animais de experimentação. Devido à presença de componentes da mielina na preparação da vacina, alguns animais desenvolveram encefalomielite pós-vacinal (HUYNH et. al., 2008a; MIX et. al., 2010b).

Existem diversas variações do modelo de acordo com o tipo de animal utilizado e o material escolhido para indução. Os primeiros animais utilizados foram os macacos *Rhesus*, imunizados com extrato cerebral de coelhos. Nesses experimentos foi observada a ocorrência de paralisia, atribuída a presença de infiltrado inflamatório perivascular e desmielinização no cérebro e medula espinhal. Sendo a frequência e gravidade da paralisias correlacionadas com o título de anticorpos presentes. Com isso, em ensaios subsequentes pesquisadores impulsionaram a resposta imune humoral com adjuvante de Freund (CFA), depois com a toxina da *Pertussis* (MIX et. al., 2010b).



Até os anos 80, os ratos eram os animais de laboratório de escolha para o estudo da EM, sendo a linhagem de Lewis a mais utilizada para a indução e estudo das características imunopatológicas da EAE. Os animais induzidos com a PBM, nesse modelo, produzem a doença de evolução secundária progressiva. Porém, a pouca desmielinização, característica presente na doença humana (EM), fez com que outros modelos fossem mais utilizados. O uso do peptídeo PLP, proveniente da proteína de proteolípídeo no camundongo de linhagem SJL produz a doença de evolução remittente-recorrente, no entanto, os animais não desenvolvem fase secundária progressiva como os pacientes com EM (CROXFORD et. al., 2010; MIX et. al., 2010b).

Atualmente o modelo mais utilizado é o de imunização de camundongos geneticamente suscetíveis a doença, da linhagem C57BL/6 pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Esse modelo se caracteriza por lesões inflamatórias e demielinizantes em nervo óptico, quiasmas e substância branca do cérebro e medula espinhal. Os infiltrados inflamatórios são perivasculares constituídos principalmente por macrófagos e linfócitos T e B. Ocorrendo também algum grau de resposta humoral com formação de títulos significativos de anticorpos anti-MOG. Sendo o sistema periférico poupado. Padrão este, muito semelhante ao encontrado na EM (CROXFORD et. al., 2010; MIX et. al., 2010b; MURTA, FERRARI, 2013).

Além do fato de que os camundongos C57BL/6, por serem geneticamente modificados, quando expostos a antígenos da mielina, expressam maior número de receptores de células T para MOG e um maior título de anticorpos anti-MOG, o que resulta em uma forma mais grave da EAE. Logo, o modelo de EAE no camundongo C57BL/6 caracteriza-se por um padrão altamente reprodutível e previsível com os animais apresentando paralisia de caráter ascendente (CROXFORD et. al., 2010; MIX et. al., 2010b).

**Quadro 1.** Modelos de EAE ativamente utilizados e suas aplicações.

<b>ESPÉCIE/ LINHAGEM</b>	<b>PEPTÍDEOS INDUTORES DA EAE</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>139-151</sub> ; PLP <sub>178-191</sub> ; PLP <sub>104-117</sub> ; MBP; MBP <sub>89-101</sub> ;	Estudo dos mecanismos do surto; controle genético de doença autoimune; desmielinização mediada por anticorpo; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
Ratos Lewis	MBP; MBP <sub>29-84</sub> ; MBP <sub>61-82</sub> ; MBP <sub>80-105</sub> ; MBP <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> )	MBP; MOG <sub>34-56</sub>	Patologia axonal; infiltrados perivascular e a desmielinização no cérebro e medula espinha; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
Sagüi comum ( <i>Callit-hrix jacchus</i> )	MOG; MOG <sub>14-36</sub>	Similar ao macaco Rhesus.

(CROXFORD, et. al., 2010; MIX, et. al., 2010b).

## 2.3 IMUNOPATOLOGIA DA EM E DA EAE

Por ser uma doença restrita ao sistema nervoso central, o estudo dos aspectos imunopatológicos da EM são limitados. A dificuldade de obtenção das amostras do tecido afetado impedem que alguns aspectos sejam estudados em seres humanos. Com isso, os estudos conduzidos em modelo experimental da EAE foram fundamentais para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo de desmielinização da doença. Tanto a EM como a EAE são consideradas doenças autoimunes mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (FLETCHER et. al., 2010; SILVA et. al., 2008a, SILVA, 2010b; MURTA, FERRARI, 2013).

As células T CD4<sup>+</sup> podem ser divididas classicamente em 4 subpopulações de respostas imunes adaptativas: Th1, Th2, Th17 e Treg. As células Th1 secretam especificamente a IL-12, INF- $\gamma$  e o 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. Para a diferenciação em Th17, o linfócito naive “virgem” deve ser estimulado pela IL-6 e pelo 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 retinóico, já que esses ativam os fatores de transcrição FoxP3 e STAT5 (BETTELLI et. al.,2006; VELDHONEN et. al., 2006; FLETCHER et. al., 2010; SILVA, 2010b; MURTA, FERRARI, 2013).

Nos últimos anos, tem sido muito estudado o papel dos subtipos de células T helper especializadas na produção de IL-17. No modelo anteriormente proposto, as células T helper CD4<sup>+</sup> eram classificadas em dois subtipos Th1 e Th2 com diferentes funções e perfis de citocinas produzidas. E o perfil classicamente envolvido na EAE era o do tipo Th1. O efeito danoso do INF- $\gamma$ , produzido por células Th1, no processo de desmielinização foi confirmado com descrição da IL-12, uma interleucina indutora de INF- $\gamma$  que

também está aumentada na EM. No entanto, a observação que animais geneticamente deficientes para IFN- $\gamma$  ou para seu receptor específico também desenvolviam EAE, sugeriu a existência de outra subpopulação de linfócitos efetores nesse modelo (BETTELLI et. al., 2006; VELDHOFEN et. al., 2006; FLETCHER et. al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013).

Com a descoberta da IL-23, interleucina que apresenta mesma subunidade p40 que a IL-12, mas difere por outra subunidade p19, como agente indutor de outra subpopulação de linfócitos T encefalitogênicos na EAE, foi identificado outro subtipo de células TCD4<sup>+</sup> que secreta a IL-17 e outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e a IL-22, as células Th17. A IL-17 é uma citocina com efeitos pleiotrópicos (podem atuar sobre muitos tipos celulares diferentes) que leva a expressão de outras citocinas como a IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , fator estimulante de colônia de granulócitos (TGF  $\beta$ ) e MCP-1 em vários tipos de células. Agindo também como coestimulador de células T e presentes também em rejeições a transplantes pela ativação de células dendríticas (HARRINGTON et. al., 2005; GONZÁLEZ-GARCIA et. al., 2009).

A importância da Th17 na EAE foi demonstrada em animais nocaute (KO) para IL-17 que apresentaram resistência parcial a doença. O fato da proteção apresentada em animais KO ser parcial mostra que a EAE não é resultado de uma resposta Th17 isolada, mas sim de uma resposta Th1 e Th17 associadas. Além do uso de anticorpos anti-IL-17 ter demonstrado proteção parcial contra o desenvolvimento da doença. Já na EM o papel da Th17 também tem sido relatada, através de análise de microarranjos onde foi encontrado um aumento da transcrição da IL-17 em lesões de EM. Amostras de LCR de pacientes com EM possuem níveis aumentados de IL-17 quando comparados com amostras de pacientes saudáveis. Além do fato de linfócitos T de memória que induzem a expressão de IL-17 e IL-23 serem capazes de passar pela BHE, promovendo assim a inflamação no SNC (ZHOU, et. al., 2007; WEI, et. al., 2007).

Os receptores de IL-17 e IL-22, foram encontrados nas células endoteliais da BHE de pacientes com EM, assim como no modelo animal a EAE, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e em contato com as respectivas citocinas, levam ao rompimento das junções intracelulares, facilitando a migração dos

linfócitos Th17 autorreativos. Evidenciando o importante papel desse tipo celular, principalmente na instauração da doença (KEBIR et. al., 2007).

Na fase de recuperação da EAE, citocinas inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  foram identificadas, tanto no SNC como na periferia. Vários estudos tem demonstrado a fundamental ação da IL-10 no controle da EAE, devido ao seu efeito imunorregulador. Na fase de recuperação da EAE a expressão de IL-10 está aumentada e sua administração exógena leva a uma redução significativa na gravidade da doença. A IL-10 foi descrita primeiramente como uma interleucina produzida pelas células Th2, que inibe a produção de citocinas pelas células Th1. Porém, tem sido demonstrado 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).

O TGF- $\beta$  pode desempenhar uma função ambigua durante a inflamação, podendo tanto promover a indução células-T, com função reguladora e imunossupressora (Treg), como o desenvolvimento de células pró-inflamatórias Th17. O fator crucial na diferenciação celular em Treg ou Th17 são os perfis de citocinas presentes no meio onde ocorre a diferenciação. Geralmente, o TGF- $\beta$  induz a expressão Foxp3 levando a diferenciação de Treg. No entanto, sob condições inflamatórias, induz juntamente com a IL-6 uma diferenciação em células Th17. Em paralelo, a inibição da expressão do TGF- $\beta$  em astrócitos e microglia melhora o curso da doença EAE (THÖNE et. al., 2012).

Após ativação na periferia, as células T podem migrar através da BHE e liberar citocinas dentro do SNC, essa migração que inicia a sequência de eventos inflamatórios locais. O processo de extravasamento de leucócitos para as regiões de inflamação se dá, pela ativação de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (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 com C5a

(fragmento de proteína liberada a partir de componente do complemento) e fator ativador de plaqueta (OSBORN et. al., 1989; WEINER, 2009).

Estas citocinas inflamatórias promovem o recrutamento de células fagocitárias (macrófagos da periferia e micróglia do SNC) que vão promover o ataque da mielina. Ocorrendo a amplificação local da inflamação após a reativação das células T autorreativas no SNC pelas células apresentadoras de antígenos, como as da micróglia. 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 (STEINMAN, 1996a; STEINMAN et. al., 2005b).

As células residentes (micróglia) ativadas no processo inflamatório são as principais responsáveis pelo dano tecidual do SNC através da liberação de NO, radicais de oxigênio ( $H_2O_2$ ), aminas vasoativas, proteínas do complemento, proteases e citocinas. 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 et. al., 2008; LINKER et. al. 2010). 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. Esta é induzida em macrófagos e em outras células. Também está envolvido no efeito excitatório do glutamato que é liberado em excesso pela micróglia e macrófagos. Esta liberação acompanhada da diminuição da recaptação e metabolismo do glutamato é extremamente tóxica para os oligodendrócitos e neurônios (MARTÍNEZ et. al., 1999; LEE et. al., 2012).

Inicialmente (fase inflamatória da doença), 85% dos pacientes apresentam ataques agudos (surtos) com recuperação completa dos sinais e sintomas. Estes surtos são atribuídos a ondas de células Th1 e Th17 que infiltram o SNC. O balanço entre estas células e as células reguladoras, como as Treg e Th2, é decisivo na determinação da atividade da doença. A fase progressiva da doença é reconhecida como secundária ao processo

degenerativo desencadeado pela inflamação (GONZÁLEZ-GARCÍA et. al., 2009).

Com isso, os tratamentos para a EM 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.

## 2.4 TRATAMENTOS PARA A ESCLEROSE MÚLTIPLA

Os primeiros tratamentos tinham como base o uso dos corticosteroides, principalmente durante os surtos, administrados num período de três a cinco dias, seguidas por doses decrescentes por duas semanas. Esses fármacos levam a diminuição do infiltrado celular inflamatório no SNC. No entanto, apresentam uma série de efeitos secundários indesejáveis como a osteoporose, a Síndrome de Cushing, erupção cutânea pustular, o aumento da pressão arterial, úlceras e, em casos raros, risco de sangramento gástrico, entre outros. Além do fato de que os corticosteroides, só se mostrarem eficazes a curto prazo para aliviar os sintomas, não tendo impacto significativo a longo prazo (MOREIRA et. al., 2002; FLETCHER et. al., 2010; MIX et. al., 2010; CORRÊA et. al., 2010; BISAGA et. al., 2012).

Logo, vários medicamentos foram lançados para o tratamento de EM nos últimos anos, chamados de terapias modificadoras da doença, porém com um controle parcial sobre a EM. Os tratamentos disponíveis consistem em interferons  $\beta$ , que são o interferon  $\beta$  -1a (com duas formulações comerciais, com os nomes comerciais *Avonex*<sup>®</sup> e *Rebif*<sup>®</sup>, os primeiros injetados semanalmente e o últimos três vezes por semana). Esta proteína possui a cadeia de aminoácidos idêntica ao interferon  $\beta$  natural humano. E do interferon  $\beta$ -1b (*Betaseron*<sup>®</sup> nome comercial nos Estados Unidos, *Betaferon*<sup>®</sup> na Europa e Japão), injetado a cada dois dias. Porém, o mecanismos de ação pelos quais o Interferon  $\beta$  exerce seu efeito terapêutico na EM, ainda não estão totalmente compreendidos. 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 (MOREIRA et. al., 2002; FLETCHER et. al., 2010; MIX et. al., 2010; BISAGA et. al., 2012).

Outro medicamento é o Acetato de glatirâmer ou *Copaxone*<sup>®</sup>, injetado diariamente, é constituído por uma mistura de polipeptídeos sintéticos compostos por quatro aminoácidos (alanina, glutamina, lisina e tirosina). É estruturalmente semelhante à Proteína Básica da Mielina, porém não causa encefalite. Os mecanismos propostos para a atividade biológica deste medicamento é 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).

Na forma secundária progressiva, mais agressiva, que muitas vezes não respondem aos medicamentos considerados “tradicionais”, a tendência é mudar o esquema terapêutico para o Natalizumab. O Natalizumab, comercializado como *Tysabri*<sup>®</sup>, é um anticorpo monoclonal contra  $\alpha$ -4 integrina. Este medicamento é um antagonista monoclonal de uma glicoproteína expressa em linfócitos e monócitos, essenciais para o processo de migração através da barreira hematoencefálica. 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).

O Fingolimod (nome comercial Gilenya<sup>®</sup>), sendo seu protótipo um produto natural com atividade imunossupressora, foi obtido através de modificação molecular de um composto isolado a partir de cultura caldos de *Isaria sinclairii*, um fungo que ataca os insetos. Foi a primeira droga imunomoduladora oral para o tratamento de EM. O Fingolimod atua bloqueando a ação do receptor em células T denominado receptor esfingosina-1-fosfato, envolvido na regulação do movimento destas células no organismo, impedindo a migração para o SNC (CHIBA, ADACHI, 2012).

A Mitoxantrona, (nome comercial Mitostate<sup>®</sup>), 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. Todos esses medicamentos diferem em sua taxa de eficácia e estudos de seus efeitos, a longo prazo ainda são escassos (MORRIS, YIANNIKAS, 2011).

A porcentagem de pacientes não responsivos para cada medicamento também varia, sendo cerca de 30% com interferons. As comparações entre os imunomoduladores demonstram que o mais eficaz é o Natalizumab em termos de redução da taxa de recaída. Os dados preliminares apontam para um efeito na progressão da doença, mas os estudos sobre o efeito, a longo prazo são necessários. Mitoxantrona é provavelmente o mais eficaz de todos eles a curto prazo; No entanto, seu uso é limitado por grave cardiotoxicidade, e não é considerado como boa terapia de longo prazo. Esta é a razão pela qual é utilizado principalmente para tratar pacientes que avançaram na EM remitente-recorrente para secundária progressiva (MORRIS, YIANNIKAS, 2011; BISAGA et. al., 2012).

Contudo, nem todos os pacientes são responsivos a todas estas terapias. Mesmo com o uso adequado de medicamentos, a maioria dos pacientes com EM ainda sofrem de alguns ataques e muitos sofrem de deficiência subsequente (MORRIS e YIANNIKAS, 2011; BISAGA et. al., 2012).

Todos os tratamentos descritos acima ainda apresentam efeitos adversos, segundo o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para Esclerose Múltipla do Ministério da Saúde do Brasil (2012), importantes como:

- **Interferon  $\beta$ -1a:** desmaios, sangramentos, mudança de humor, febre, dores musculares, náuseas, diarreia, cefaleia, dor ou desconforto no local de aplicação da injeção.

- **Interferon  $\beta$ -1b:** depressão, ansiedade, mudanças no ciclo menstrual, diarreia, constipação, vômitos, dor de estômago, tonturas, arritmia cardíaca, febre, dores musculares, cefaleia. No local de aplicação da injeção pode ocorrer dor, prurido e eritema.

- **Acetato de glatiramer:** alguns minutos após aplicação do medicamento podem ocorrer, rubor, ansiedade, bradicardia, hipertensão. No local de aplicação da injeção pode ocorrer dor, prurido e eritema.

- **Natalizumab:** Infecção das vias urinárias, naso-faringite, urticária, reações de hipersensibilidade, cefaléia, tonturas, leuco-encefalopatia multifocal progressiva, vômitos e náuseas.

- **Fingolimod:** infecções respiratórias altas, bradicardia e hipertensão, e susceptibilidade à infecção por influenza. A taxa de incidência de cânceres de pele mais alta. Usando concomitantemente com, corticosteroides pode levar a encefalite pelo vírus da herpes.

- **Mitoxantrona:** arritmia cardíaca, aumento dos batimentos cardíacos, insuficiência cardíaca congestiva, queda da pressão arterial, conjuntivite; cor amarelada na pele ou nos olhos, convulsão, cefaleia, febre, depressão da medula óssea, infecção, queda de cabelos, diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos, dificuldade para respirar, dor no tórax, sangramento gastrointestinal, tosse, equimose, erupção na pele, necrose da pele (se houver extravazamento do líquido da injeção), urticária, flebite no local da injeção e insuficiência renal.

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas ao longo dos anos buscando novas alternativas terapêuticas para o tratamento da EM. Recentemente o FDA (Food and Drug Administration) aprovou dois novos medicamentos de uso oral para o tratamento da EM, com indicação, principalmente, para pacientes com a forma remitente-recorrente da doença. Primeiramente, o Teriflunomida (Aubagio<sup>®</sup>), aprovado em setembro de 2012, um imunomodulador que reduz a ativação, proliferação e função dos linfócitos T e B. Contudo, apresenta elevada hepatotoxicidade e riscos elevados de malformação congênita. E em março de 2013, o Tecfidera<sup>®</sup> (fumarato de dimetila), que reduz de maneira eficaz a atividade da doença principalmente por suas propriedades antioxidantes que podem ser protetoras contra danos no cérebro e medula espinhal (FDA).

Porém, além do fato das terapias imunomoduladoras apresentarem vários efeitos adversos os custos são elevados. Segundo BERTO, et. al. (2011) em estudos realizados na Europa, os custos com os pacientes tendem a aumentar com sua gravidade clínica. Estima-se que o custo médio por paciente com gravidade leve seja de 18.000 € e 36.500 € em pacientes com gravidade moderada e 62.000 € em pacientes com doença grave. E apesar de no Brasil não haver muita informação a respeito do custo da EM, em Minas Gerais a

Secretaria de Saúde gastou no ano de 2001 R\$ 4.683.780,00 em medicamentos imunomoduladores para EM - 8,54% do orçamento para compra dos 38 itens de Medicamentos Excepcionais – Portaria SAS/MS No 341 de 22/08/2001 (LANA-PEIXOTO et. al., 2002a).

Em estudo mais recente, realizado por BRANDÃO et. al. (2011) para descrever os gastos do Ministério da Saúde do Brasil com os usuários do Programa de Medicamentos de Alto Custo, entre 2000-2004, onde a EM se insere, revela que o gasto mensal com as terapias imunomoduladoras por paciente é em média de R\$3.258,43.

Diante do exposto, como a cura da EM ainda não foi possível, torna-se relevante pesquisas que busquem alternativas terapêuticas mais eficazes tanto clinicamente como economicamente e que forneçam além de eficácia farmacológica menores efeitos adversos.

## 2.5 PRODUTOS NATURAIS COMO PROTÓTIPOS PARA NOVOS FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E IMUNOMODULADORES

A utilização de plantas para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas da prática medicinal na humanidade (PUPO, GALLO, 2007; NEWMAN, CRAGG, 2012). As plantas e microrganismos exibem complexa interação com o meio ambiente e produzem metabólitos, chamados metabólitos secundários, utilizados para sua sobrevivência e adaptação. Essas substâncias constituem importantes fontes de moléculas biologicamente ativas (PUPO, GALLO, 2007; MISHRA, TIWARI, 2011).

Das várias aplicações terapêuticas das plantas medicinais, muitos apresentam atividade anti-inflamatória e analgésica, sendo largamente utilizados na medicina popular para este fim. Os analgésicos e anti-inflamatórios são um dos melhores exemplos da estreita relação entre processos de seleção de plantas medicinais, farmacologia e a química moderna (CARVALHO, 2004a; NABAS et. al., 2009).

Como exemplo, a morfina (analgésico), isolada pela primeira vez por Friedrich Wilhelm Adam, sendo um alcalóide natural extraído da planta *Papaver somniferum* (Papaveraceae). Outro exemplo clássico é o ácido acetilsalicílico, o qual foi produzido sinteticamente a partir da otimização de um protótipo molecular ativo de origem vegetal, a salicina, sendo esta isolada e obtida a partir das cascas do salgueiro (*Salix sp*) (PUPO, GALLO, 2007; BARREIRO, 2009; COSTA, 2009).

Com relação ao desenvolvimento atual de novos medicamentos, a maioria dos novos fármacos em uso clínico ou foi obtida a partir de fontes naturais ou foi desenvolvida por modificação molecular e/ou síntese orgânica a partir de protótipos ativos de substâncias naturais, especialmente metabólitos secundários vegetais (NEWMAN, CRAGG, 2012). Assim, mesmo existindo diversas estratégias para a obtenção de novos medicamentos, o estudo da atividade biológica de metabólitos secundários continua sendo uma valiosa ferramenta para a descoberta de novos protótipos ou de fármacos inovadores (BARREIRO, 2009; COSTA, 2009; MISHRA, TIWARI, 2011).

Com relação à importância dos produtos naturais para a obtenção de novos fármacos imunomoduladores, nos últimos anos grande número de extratos vegetais e constituintes isolados vem sendo investigado quanto ao seu potencial imunomodulatório (PROVENZA, VILLALBA, 2010). Esses estudos têm despertado interesse em todo o mundo como alternativa aos métodos terapêuticos tradicionais. Atualmente sabe-se que os produtos naturais com atividade anti-inflamatória, usados como imunomoduladores, podem ser ferramentas úteis para a intervenção em doenças autoimunes e neurodegenerativas (CARVALHO, 2004; NABAS et. al., 2009).

Exemplo disso é o trabalho realizado por CHEN et. al. (2010), no qual foi avaliado a ação imunomodulatória do Ostol, uma cumarina natural de reconhecida atividade anti-inflamatória e principal constituinte de *Cnidium monnier* (Umbelliferae), sobre o curso da EAE. Assim como em trabalho realizado por DUTRA et. al. (2012), que avaliou o potencial imunomodulador do Euphol, um triterpeno tetracíclico encontrado na planta brasileira conhecida como Aveloz (*Euphorbia tirucalli*) e popularmente utilizada como anti-inflamatória. Os trabalhos realizados evidenciaram que estas 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. Com isso, estudos como esses reiteram a importância da utilização de extratos vegetais ou seus metabólitos secundários isolados como agentes inibidores da resposta inflamatória (COUTINHO et. al., 2009).

Neste sentido, dentre as os compostos naturais ativos com grande potencial farmacológico, principalmente sobre o sistema imune, destacam-se a Licochalcona A e o *trans*-cariofileno, os quais apresentam atividades biológicas de grande importância, especialmente a anti-inflamatória (TAGO et. al., 2010; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2010c; VEIGA Jr, et. al., 2007; Da SILVA, et. al. 2012).

### 2.5.1 Raiz de alcaçuz e a Licochalcona A

As espécies vegetais do gênero *Glycyrrhiza* são popularmente conhecidas como Alcaçuz. Entre as principais espécies deste gênero estão a *Glycyrrhiza inflata*, *Glycyrrhiza uralensis* e a *Glycyrrhiza glabra*, sendo esta última a mais comercializada no Brasil e no mundo (ASL, HOSSEINZADEH, 2008), fazendo parte, inclusive, das plantas medicinais listadas na Farmacopéia Brasileira 3ª Edição.

O alcaçuz é uma planta nativa da região Mediterrânea, mas cresce em diversas regiões do mundo, sendo muito utilizada na medicina tradicional, principalmente na China (GUPTA et. al., 2008; ASL, HOSSEINZADEH, 2008).

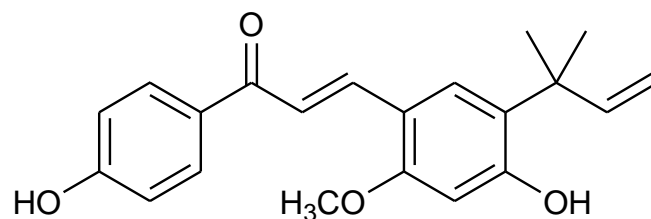
As raízes (figura 3), caracteristicamente doces desta planta, são as principais fonte de suas propriedades medicinais, como hepatoprotetora e, especialmente, de suas atividades anti-inflamatórias (FURUSAWA et. al., 2009; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2009b; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2010c).



**Figura 3.** Raiz de alcaçuz

Fonte: <http://www.thebodynature.com/> (2012)

A Lico A (figura 4) é a principal chalcona encontrada nas raízes de uma das espécies de alcaçuz, a *Glycyrrhiza inflata* (CHIARADIA et. al., 2008; FURUSAWA et. al., 2009; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2010c).



**Figura 4.** Estrutura química da Lico A

O termo chalcona caracteriza uma série de compostos, que possui o 1,3-diarilpropano como núcleo principal, modificado pela presença de uma ligação olefínica e de uma carbonila (CHIARADIA et. al., 2008)

A Lico A apresenta várias atividades biológicas, como antiparasitária, antimicrobiana e, sobretudo, anti-inflamatória (FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2009b; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2010c). Recentemente, foi evidenciado potencial inibitório desta chalcona na produção de mediadores químicos, como as prostaglandinas (E2) e IL-1 em fibroblastos de pele humana, sendo esta substância também capaz de suprimir, de maneira dose-dependente, a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 (KOLBE et. al., 2006; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2008a).

Além disso, a Lico A é capaz de inibir o gene Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (STAT3) também de maneira dose-dependente (FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2008a). Considerando a importância desta atividade da Lico A, a via de sinalização STAT-3/IL-6 é fundamental para o desenvolvimento de células Th17 produtoras de IL-17. Esse tipo celular está ativamente envolvido em doenças autoimunes, como a EM (ZHOU, et. al., 2007; WEI, et. al., 2007). Com isso, substâncias inibidoras de IL-17 vêm sendo investigadas como possíveis tratamentos para doenças autoimunes. Neste sentido, ensaios clínicos realizados com anticorpos anti-IL-17 em pacientes com psoríase (uma doença de origem autoimune), demonstraram resultados extremamente promissores no tratamento desta doença (GARBER, 2012).

Segundo FUNAKOSHI-TAGO et. al. (2009b, 2010c), a Lico A também possui a capacidade de inibir a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) em linhagem de células de fibroblastos NIH-3T3. O NF- $\kappa$ B é produzido principalmente por macrófagos, porém outras células são capazes de produzi-lo, como células linfóides, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e tecidos

neuronal. Este fator atua na regulação da expressão de diversos genes, principalmente aqueles relacionados à resposta imunológica e inflamatória. A ativação do NF- $\kappa$ B, leva a um aumento na produção de várias citocinas, imunoreceptores, moléculas de adesão celular e substâncias envolvidas no processo de apoptose.

Devido a isso, o NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição central da resposta inflamatória em células imunocompetentes (tanto as periféricas como macrófagos, quanto no sistema nervoso central, como as células da glia). No sistema nervoso central, a regulação da expressão gênica pelo NF- $\kappa$ B é de particular importância já que este fator pode estar envolvido tanto em condições fisiológicas (sinapse, desenvolvimento e plasticidade neural) como em condições patológicas que ocasionam neurodegeneração e morte celular, como no caso da EM (FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2009b; FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2010c).

A Lico A, demonstrou ainda, capacidade de diminuir a expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzível (*iNOS*) em linhagens de macrófagos RAW264.7 e macrófagos peritoniais, em ensaio realizado *in vitro* com células de camundongos C57BL/6. Essas enzimas são fundamentais para o controle da biossíntese de óxido nítrico (NO). O NO, quando produzido em grandes quantidades por macrófagos e outras células do sistema imune, tem efeito citotóxico e citostático. Nos processos inflamatórios, o NO também é liberado pelo endotélio vascular pela estimulação de bradicinina, histamina e serotonina, modulando a formação de edema pela vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo no local. Na EM o NO, juntamente com o peróxido de hidrogênio, é responsável pela lesão direta da bainha de mielina (FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2009b; LEIPER e NANDI, 2011).

De acordo com estudo realizado por UDOMPATAIKUL e SRISATWAJA (2011), a Lico A apresentou eficácia equivalente quando comparada ao uso de hidrocortisona no tratamento de Dermatite Atópica (DA). Sendo que a hidrocortisona é considerada tratamento padrão e efetivo desta enfermidade. A DA é uma doença autoimune, caracterizada por uma reação de hipersensibilidade tipo I, se apresentando como doença de evolução crônica e recidivante que acomete principalmente pacientes pediátricos.



De acordo com BARFOD et. al. (2002), a Lico A provoca a inibição da proliferação de linfócitos, estimulados por fitohemaglutinina. Levando também a inibição da produção de IFN- $\gamma$  (citocina produzida principalmente por células Th1) e produção TNF- $\alpha$  por monócitos humanos de maneira dose-dependente, sem, no entanto, interferir na sua liberação.

Além disso, foi observado também que a pré-administração oral de Lico A (30mg/kg) diminuiu significativamente os níveis séricos de TNF- $\alpha$  em camundongos C57BL/6 após a injeção de LPS “*in vivo*” (FURUSAWA, et. al., 2009), sendo que a produção de TNF- $\alpha$  também foi inibida em cultura de células NIH-3T3 pela Lico A (TAGO et. al., 2010). O que nos leva a crer na possibilidade da Lico A desempenhar algum papel benéfico na terapêutica de doenças autoimunes como a EM.

Os trabalhos realizados demonstrando o potencial imunomodulatório da Lico A encontram-se descritos, resumidamente, a seguir na tabela 1.

**Tabela 1.** Dados apresentados na literatura sobre o possível efeito imunomodulatório da Lico A.

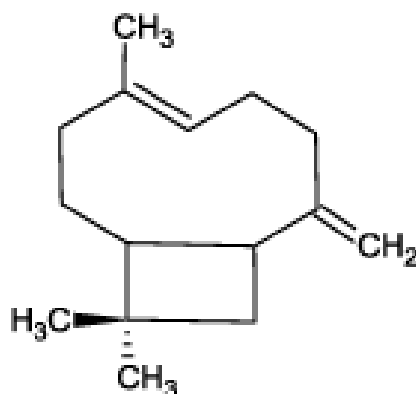
<b>AUTOR</b>	<b>MEDIADOR QUIMICO INIBIDO</b>	<b>MODELO UTILIZADO</b>	<b>ESTIMULO</b>
BARFOD et. al., 2002.	Proliferação de linfócitos e a produção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$	Células mononucleares humanas em cultura	Fitohemaglutinina
FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2008c.	STAT3	Cultura de celulares Ba/ F3	IL-3
FURUSAWA, et. al., 2009.	TNF- $\alpha$	Camundongos C57BL/6	LPS
FURUSAWA, et. al., 2009.	Expressão <i>i</i> NOS	Macrófagos RAW264.7	LPS
FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2009a.	TNF- $\alpha$ e NO	Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 em	LPS
FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2009a / 2010c.	Níveis séricos de TNF- $\alpha$ induzidos pela ativação do NF-kB.	Cultura de células NIH-3T3	Proteína ativada por mitogénio família da quinase

### 2.5.2 Óleo de Copaíba e o *trans*-cariofileno

As copaíferas são árvores comumente encontradas na América Latina, especialmente nas regiões Sudeste e Amazônica. Seu óleo-resina é obtido pela extração, geralmente por meio de incisões ou perfurações no caule, sendo muito utilizado popularmente devido a grande variedade de propriedades farmacológicas que apresenta (VEIGA JR et. al. 2007). No Brasil, a copaíba é uma árvore nativa e está localizada na região sudeste, centro-oeste e na região amazônica. Existem mais de 20 espécies no país, sendo as mais comuns a *Copaifera langsdorfii* (particularmente importante por estar distribuída por todo o território) (VEIGA JR et. al. 2007), *Copaifera officinalis*, *Copaifera reticulata* e *Copaifera multijuga* (YAMAGUICHI, GARCIA, 2012).

A aplicação medicinal do óleo de copaíba é extensa, sendo utilizada principalmente devido à suas ações antissépticas do aparelho urinário, cicatrizante, anti-inflamatória e antitumoral. Dentre estas, a atividade anti-inflamatória é, sem dúvida, a mais difundida na medicina popular, principalmente na região amazônica (VEIGA JR et. al., 2007; YAMAGUICHI, GARCIA, 2012).

Quimicamente, o óleo-resina de copaíba pode ser definido como uma mistura de ácidos diterpênicos em um óleo essencial constituído majoritariamente por sesquiterpenos, principalmente o *trans*-cariofileno (aproximadamente 60% da constituição do óleo-resina) (CHICARO, 2009). O *trans*-cariofileno (Figura 5) está presente em diversas espécies de *Copaifera* e as concentrações desta substância podem variar nas diferentes espécies, resultando em uma atividade terapêutica diferenciada entre os óleos (FERNANDES et. al., 2007; VEIGA JR et. al., 2007; YAMAGUICHI, GARCIA, 2012).



**Figura 5.** Estrutura química do *trans*-cariofileno.

A atividade anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba tem sido demonstrada em diversos estudos, como no trabalho de YAMAGUCHI e GARCIA (2012), onde o tratamento com óleo inibiu a formação de edema, em modelo induzido por carragenina em camundongos Balb/c e, com isso, reduziu a formação de granuloma com diminuição da permeabilidade vascular e a diminuição na produção de NO por macrófagos. Característica essa altamente relevante, tendo em vista, como dito anteriormente, que o NO é um dos responsáveis pela lesão direta lesão à bainha de mielina na EM.

O óleo de copaíba também é capaz de diminuir a expressão do NF-κB, o qual possui grande importância na imunopatogênese da EAE. Além disso, foi observado que o óleo de copaíba apresentou melhor eficácia que a dexametasona na inibição do NF-κB, diminuindo a proliferação de células originadas de carcinoma epidermóide de orofaringe (CHICARO, 2009). Fato que se torna relevante, considerando que os corticoides são utilizados no tratamento da EM, este estudo ratifica o potencial do óleo de copaíba no tratamento desta doença.

Com isso, considerando a correlação entre as atividades biológicas do óleo de copaíba com o *trans*-cariofileno, a atividade anti-inflamatória deste composto foi demonstrada quando avaliada em ratos Wistar e camundongos Swiss. O *trans*-cariofileno apresentou marcante atividade anti-inflamatória, levando a redução do edema de pata induzido por ovalbumina e por carragenina, quando administrado oralmente na dose de 50 mg/kg. Essa substância também foi capaz de inibir a produção de COX-2, *i*NOS e TNF-α, quando administrada por via oral. Tendo em vista que a COX-2 e o *i*NOS são

importantes enzimas envolvidas nos processos inflamatórios (FERNANDES et. al., 2007).

Em trabalho realizado por MEDEIROS et. al. (2007), o *trans*-cariofileno inibiu a migração de neutrófilos induzida por LPS no edema de pata em ratos. E em estudo realizado por CHO et. al. (2007), o *trans*-cariofileno reduziu o infiltrado inflamatório no cólon, diminuindo os níveis de mieloperoxidase, INF- $\gamma$  e IL-6, em colite induzida por dextrana (modelo clássico de inflamação), acarretando com isso, uma melhora significativa no quadro da doença.

Em suma, trabalhos que mostram o potencial imunomodulatório do *trans*-cariofileno encontram-se na tabela 2.

**Tabela 2.** Dados apresentados na literatura sobre o possível efeito imunomodulatório do *trans*-cariofileno.

AUTOR	MEDIADOR QUIMICO INIBIDO	MODELO UTILIZADO	ESTIMULO
FERNANDES et. al., 2007	COX-2, <i>i</i> NOS e TNF- $\alpha$ ,	Camundongos Swiss e Ratos Wistar	Ovalbumina e Carragenina
MEDEIROS et. al., 2007	Migração de neutrófilos	Ratos de Lewis	LPS
CHO et. al., 2007	Infiltrado inflamatório e INF- $\gamma$ e IL-6	Camundongos CD1	Dextran

Pelo exposto anteriormente levando-se em consideração os mecanismos imunológicos da EAE, e considerando que a Lico A inibe IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , NO, inibe a expressão do NF-kB e STAT-3 (sinalizador intracelular de IL-17) e o *trans*-cariofileno exerce efeito inibitório sobre o INF- $\gamma$ , *i*NOS e TNF- $\alpha$ , torna-se relevante estudar os possíveis efeitos imunomodulatórios da Lico A e do *trans*-cariofileno no curso clínico, na modulação da resposta inflamatória, e nos aspectos histológicos do SNC da EAE induzida em camundongos C57BL/6 como modelo de estudo para a EM.

### 3.0 OBJETIVOS:

#### 3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos da Lico A e do *trans*-cariofileno sobre a evolução clínica, aspectos histológicos do SNC e sobre a produção de mediadores inflamatórios em sobrenadante de culturas celulares de camundongos C57BL/6 com Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) como modelo de estudo para a Esclerose Múltipla.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- A) Isolar e purificar a Lico A à partir do extrato seco das raízes de alcaçuz, tendo em vista a realização dos ensaios biológicos propostos;
- B) Verificar os efeitos da Lico A e do *trans*-cariofileno sobre o curso clínico da EAE, através do peso médio dos animais e escores clínicos da doença induzida em camundongos C57BL/6;
- C) Avaliar os efeitos do tratamento com a Lico A e o *trans*-cariofileno sobre os níveis dos radicais livres peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO) produzidos por cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6;
- D) Avaliar os efeitos do tratamento com a Lico A e o *trans*-cariofileno sobre os níveis das citocinas IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidos por cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6;
- E) Investigar os efeitos do tratamento com a Lico A e o *trans*-cariofileno sobre os aspectos histológicas no SNC.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O *trans-cariofileno* foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

A Lico A foi isolada e purificada a partir de extrato seco da raiz *Glycyrrhiza inflata* (GI), região de *Xinjiang*, o qual foi adquirido comercialmente (Shanghai Openchem International CO., Ltd);

### 4.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA A OBTENÇÃO DA LICO A

#### 4.2.1 INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA

O Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) dispôs dos seguintes equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho:

- Rotaevaporador (Buchi RII)
- Bomba (Buchi V-700)
- Lâmpada UV 254 e 366 nm (Pró-analise)
- Balança analítica (Marte-BL32)

#### 4.2.2 MATERIAIS CROMATOGRÁFICOS

Para as extrações e sistemas cromatográficos, utilizaram-se solventes de grau P.A., das marcas *Merck*, *Vetec* e *Alphatec*;

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

- para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizou-se com adsorvente placas de sílica gel flexíveis (cromatofolha de alumínio) Whatman (60 F254, *Merck*) 10x10 cm.

- para cromatografia líquida a vácuo (CLV), utilizou-se coluna cromatográfica de vidro com placa sintetizada, de dimensões 20 cm de altura e 10 cm de diâmetro. O sistema cromatográfico consistiu de coluna cromatográfica e bomba de vácuo. A coluna de vidro foi preenchida com 200g de sílica (sendo 100g de sílica 15-40 mm e 100g de sílica 60H, ambas da *Merck*) devidamente homogeneizadas e compactadas. A amostra foi aplicada no topo da coluna empacotada e a coluna eluída com o sistema de eluotrópico de solventes com polaridade crescente

- para a cromatografia tipo *flash* (CFlash), foi utilizada coluna cromatográfica de vidro (25 cm x 2 cm), preenchida com 20g de sílica 60 (0,063 – 0,200 mesh, *Merck*) até altura de 20 cm. A amostra (GI.V3) foi homogeneizada, incorporada em quantidade suficiente de sílica gel 60 e utilizada vazão de 5 cm/min.

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

#### 4.2.3 Obtenção do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para confirmação da estrutura química da Lico A foram registrados em espectrômetros Brucker – Avance DPX 300, operando em 300 MHz (RMN de  $^1\text{H}$ ) e 75 MHz (RMN de  $^{13}\text{C}$ ), utilizando metanol deuterado como solvente da marca *Aldrich*.



### 4.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LICO A

A Lico A foi obtida a partir do extrato seco das raízes de alcaçuz chinesa *Glycyrrhiza inflata* (GI) (Shanghai Openchem International Co., Ltd ).

Inicialmente, este extrato foi solubilizado em metanol (MeOH) e submetido à análise em CCDC juntamente com padrão de Lico A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), utilizando-se diversos sistemas de eluentes e diferentes tipos de reveladores (vanilina sulfúrica, anisaldeído sulfúrico, luz UV), com a finalidade de se identificar a presença de Lico A. Depois de identificada a presença de Lico A neste extrato (GI), o mesmo foi submetido ao fracionamento cromatográfico com a finalidade de isolar e purificar a Lico A.

Assim, parte deste extrato seco (15 g) foi submetido à CLV. Foram coletadas 9 frações, utilizando-se como eluentes hexano (Hex) e acetato de etila (AcOEt) em misturas com polaridades crescentes. Os solventes foram removidos por evaporação rotatória e após análise destas frações por meio de CCDC juntamente com o padrão de Lico A, foi possível agrupá-las em 5 subfrações, conforme descrito no Tabela 3.

**Tabela 3.** Grupo de frações obtidas por CLV do extrato seco (15g) da raiz de alcaçuz (GI).

ELUENTES	FRAÇÕES	MASSA (g)
Hex: AcOEt 95:5	GI.I	0,05
Hex: AcOEt 90:10	GI.II	0,15
Hex: AcOEt 70:30	GI.III	0,18
Hex: AcOEt 50:50	GI.IV	0,42
Hex: AcOEt 40:60 →0:100	GI.V	10,53

Após análise das frações obtidas por meio de CCDC utilizando-se padrão da Lico A e, observando-se a presença de sólido amarelo na fração GI.V (10,5g), esta fração foi submetida a novo fracionamento cromatográfico por CLV. Foram coletadas 8 frações de 1000 mL cada, utilizando-se como

eluentes diclorometano (DCM) e MeOH em misturas com polaridades crescentes, conforme descrito na Tabela 4.

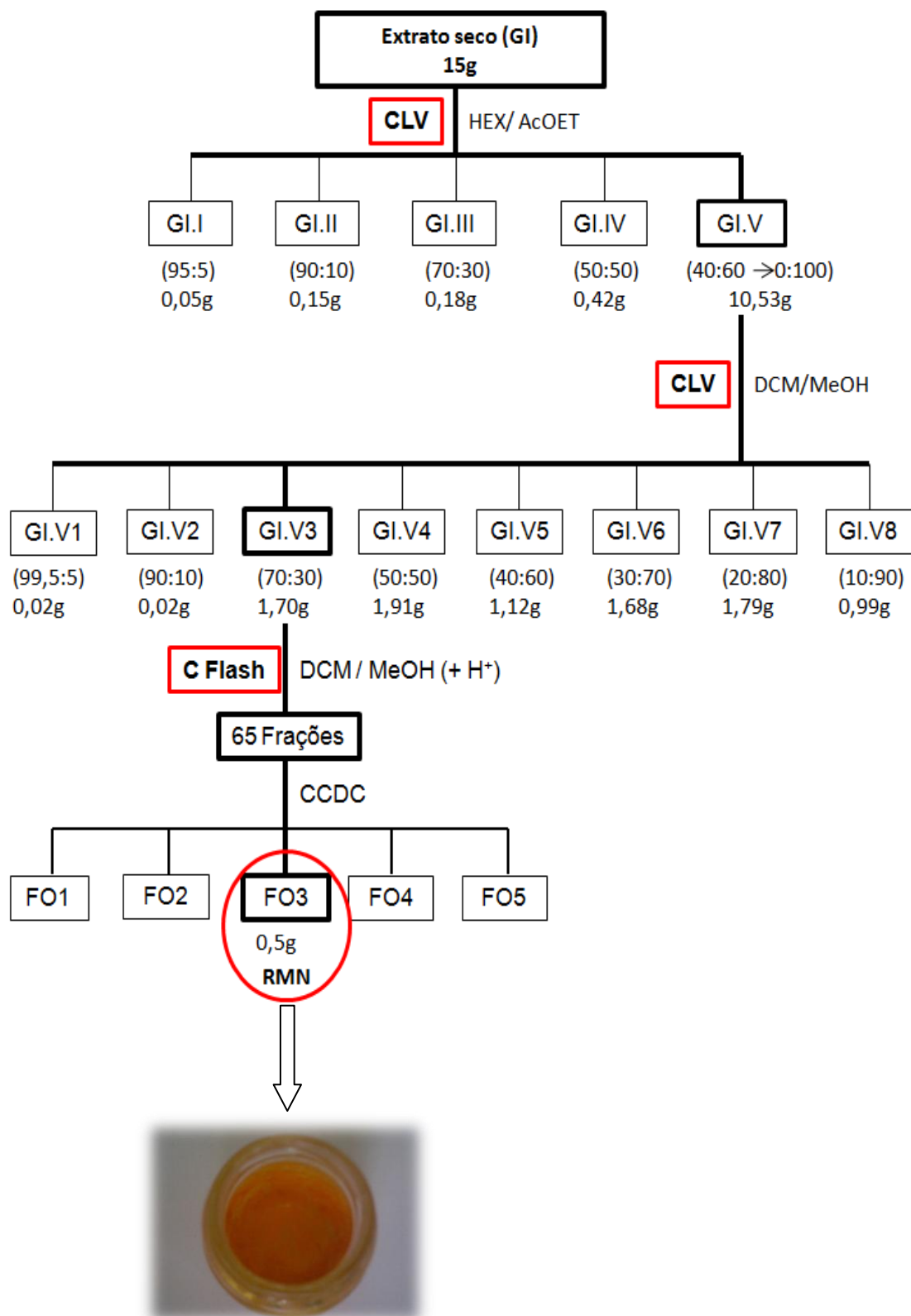
**Tabela 4** – Grupos de frações obtidas por CLV da fração GI.V (10,5g).

ELUENTES	FRAÇÕES	MASSA (g)
DCM: MeOH 99,5:0,5	GI.V1	0,02
DCM: MeOH 99:1	GI.V2	0,02
DCM: MeOH 98:2	GI.V3	1,70
DCM: MeOH 97:3	GI.V4	1,90
DCM: MeOH 95:5	GI.V5	1.12
DCM: MeOH 90:10	GI.V6	1.68
DCM : MeOH 50:50	GI.V7	1.79
MeOH	GI.V8	0,99

Após análise das frações obtidas por meio de CCDC utilizando-se padrão da Lico A e, observando-se a presença de sólido amarelo na fração GI.V3(1.70g).

Esta fração (GI. V3), foi submetida à cromatografia do tipo *flash*, utilizando como eluente DCM:MeOH 95:5 v/v e 0,01% ácido acético. Foram obtidas 65 frações, de 50 mL cada, as quais foram analisadas por CCDC permitindo agrupa-las em apenas 5 subfrações, denominadas de FO1, FO2, FO3, FO4 e FO5. Mediante a análise em CCDC, observou-se a presença de uma única mancha na fração FO3 (0,5g), a qual se apresentava como um sólido amarelo. Esta substância isolada foi submetida à análise espectroscópica por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) (figura 7) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) (figura 8), tendo sua estrutura química confirmada como sendo a Lico A.

O resumo do processo de isolamento e purificação da Lico A encontra-se na Figura 6 a seguir.



**Figura 6-** Fluxograma geral do procedimento de fracionamento do extrato seco de raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza inflata*) para a obtenção da Lico A

#### 4.4 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas, com 8-12 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Eles permaneceram na sala de manutenção de animais do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia, em estantes climatizadas e dieta *ad libitum* e durante a fase de doença clínica as mamadeiras tiveram os bicos alongados e as rações trituradas para facilitar a alimentação dos mesmos. Todos os procedimentos 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° 039/2010) (Anexo 1).

#### 4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Ao todo foram utilizados 30 animais, destes 5 foram utilizados como controle negativo e não receberam qualquer tipo de tratamento (a não ser os veículos) e foram analisados e sacrificados para análises padrões de clínica, histologia, dosagens de citocinas e de radicais livres em condições fisiológicas. Os demais foram, divididos em cinco grupos como mostrado abaixo e sacrificados no 20° dia pós-indução da EAE (pico da doença em camundongo C57BL/6):

**Grupo I (controle negativo):** camundongos C57BL/6 sem indução da EAE injetados com veículo (CFA e Toxina *Pertussis*) (n:05);

**Grupo II (controle positivo):** camundongos C57BL/6 com a indução da EAE (n:05);

**Grupo III:** camundongos C57BL/6 com indução da EAE e tratados com Lico A V.O 15 mg/Kg/dia após início dos sintomas (n:05);

**Grupo IV:** camundongos C57BL/6 com indução da EAE e tratados com Lico A V.O. 30 mg/Kg/dia após início dos sintomas (n:05);

**Grupo V:** camundongos C57BL/6 com indução da EAE e tratados com *trans*-cariofileno V.O. 25 mg/kg/dia após início dos sintomas (n:05);

**Grupo VI:** camundongos C57BL/6 com indução da EAE e tratados com *trans*-cariofileno V.O. 50 mg/kg/dia após início dos sintomas (n:05);

#### 4.6 INDUÇÃO DA EAE

Os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.) em ambos os lados da base da cauda com 100 µL de emulsão antigênica contendo: 100 µg do peptídeo MOG<sub>35-55</sub> (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) e adjuvante completo de Freund (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 5) sendo sacrificados no 20º dia após a inoculação.

#### 4.7 TRATAMENTO APÓS A INDUÇÃO DE EAE

Os animais foram observados diariamente por um período mínimo de duas horas/dia desde o dia da indução até o final do experimento por no mínimo dois observadores. Após a indução da EAE, o tratamento com Lico A e *trans*-cariofileno foi iniciado, quando pelo menos 80% dos grupos apresentava pelo menos um animal com escore 1 (perda no tônus da calda- tabela 5). Para isso as substâncias testadas foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%) com 5% de Tween 80 e administradas por via oral em 200 µl nas dosagens de 15 e 30 mg/Kg/dia de Lico A (FURUSAWA, et. al., 2009) e 25 e 50 mg/Kg de

trans-cariofileno (FERNANDES et. al., 2007) dia, respectivamente, utilizando agulha de 20 mm de gavagem. Ambas foram administradas a partir do início dos sintomas até o pico clínico da doença de forma ininterrupta como mostrado nos grupos anteriormente descritos.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS

Depois da inoculação, os animais foram observados diariamente por duas horas e os sinais clínicos foram registrados de acordo com LEADBETTER (1998), MOHAMED et. al. (2004), PERON (2010) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Escore clínico dos C57BL/6 com EAE.

<b>ESCORE</b>	<b>SINAIS CLÍNICOS</b>
0	SADIO
1	PERDA DE TÔNUS DA CAUDA
2	PARALISIA PARCIAL PATAS TRASEIRAS
3	PARALISIA SEVERA PATAS TRASEIRAS
4	PARALISIA SEVERA PATAS TRASEIRAS E PARALISIA PARCIAL PATAS DA FRENTE
5	MORTE

Os resultados foram expressos de acordo com a média diária dos escores neurológicos observados, calculados pela fórmula abaixo:

$$\bar{X} = \frac{\sum(x_1)}{N}$$

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PESO

Os animais foram pesados diariamente em balança analítica (martel-BL320H), sendo avaliada a média diária de cada grupo, com base na fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum(x_1)}{N}$$

(Somatório dos valores de peso individual de cada animal do grupo, dividido pelo número de animais de cada grupo). A perda de peso em relação ao início do protocolo experimental foi calculado nos dias 0° (da indução), 2°, 4°, 6°, 8°, 9°, 10°, 11°, 12°, 13°, 14°, 15°, 16°, 17°, 18° e 19° dia pós indução da EAE.

#### 4.10 OBTENÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS, ESPLÊNOCITOS E TECIDO NERVOSO CENTRAL

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

##### 4.10.1 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 desprendimento 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. Foram utilizadas

células provenientes dos 5 camundongos pertencentes a cada grupo experimental.

Após a coleta, os lavados foram centrifugados a 1200 rpm, 8 min, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células foi ressuspensão 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 para a realização das dosagens de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.10.2 Obtenção dos esplenócitos

O baço dos animais foi coletado de maneira asséptica e, após lavagem com solução de RPMI incompleto estéril, foi macerado em 5 mL desta mesma solução. As células foram centrifugadas (1200 rpm, 8 min, 4°C) e o botão celular ressuspensão 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 aqui a viabilidade das células. Fazer-se-a, então, o ajuste de  $2 \times 10^6$  células/mL e colocadas em cultura por 48 horas com ou sem estímulo. Após este procedimento o sobrenadante foi coletado para dosagens de citocinas.

#### 4.10.3 Preparo do material do SNC

Os materiais do SNC, após obtenção, foram mantidos imersos em soluções fixadoras de formol tamponado a 10% (4g de fosfato de sódio



monobásico, 6,5 g de fosfato de sódio dibásico, 100mL de formol P.A e 900 mL de água destilada). Após dissecação, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) em banhos de 1 hora cada, sendo feitos 3 banhos em álcool absoluto. Posteriormente, foram clarificados em 3 banhos em xilol de 1 hora cada e finalmente feita à impregnação em parafina em estufa a 58°C e a inclusão na parafina a temperatura ambiente. Os blocos foram então cortados em micrótono modelo "820" Spencer com espessura de 5 µm para coloração de hematoxilina – eosina .

#### 4.11 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

Os cortes foram desparafinados em três trocas de xilol (dois minutos cada) e hidratados em soluções de etanol com concentrações decrescentes com duas trocas a 100%, uma a 90% e uma a 70% (dois minutos em cada troca) e lavados em água destilada.

##### 4.11.1 Hematoxilina e Eosina (Luna, 1968; Carvalho, 1999)

Após a hidratação dos tecidos, estes, foram corados durante 15 minutos pela Hematoxilina de Harris: 5 g de hematoxilina dissolvidos em 50 mL de álcool absoluto e 100 g de alúmen de amônio ou potássio em 1000 mL de água destilada aquecida misturaram-se as duas soluções, deixar ferver, em seguida adicionado 2,5 g de óxido de mercúrio, reaquecido até tornar-se púrpuro escuro; Foram retiradas do aquecimento e esfriadas rapidamente. Foram adicionados de 2 a 4 mL de ácido acético glacial por 100 mL de solução, este foi filtrado antes do uso e o material foi lavado e azulado em água corrente por 5 minutos e água amoniacal (200mL de água destilada com 3 gotas de

hidróxido de amônio), corados pela solução de eosina aquosa 1% durante 2 minutos e diferenciados em etanol a 70%.

#### 4.12 ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA

Para análise histopatológica descritiva, foram obtidos cortes histológicos corados por HE da medula espinhal, cérebro e cerebelo, de todos os animais do experimento, observando-se as características corticais particulares de cada órgão, bem como as características da substância branca. Os aspectos observados durante a análise histopatológica foram a morfologia neuronal, presença e estruturas de fibras mielínicas, celularidade glial do neuróplilo, bem como, intensidade, localização e composição leucocitária do infiltrado inflamatório.

Todos os cortes foram avaliados por 2 profissionais com experiência e formação em histopatologia em microscópio Axiostar plus<sup>®</sup>, Câmera Sony<sup>®</sup> DCR-PC 100 e Software Axiovision release<sup>®</sup> versão 4.8 em aumento de 250, 400 e 1000X. Após observação, foram selecionadas para captura digital áreas significativas da morfologia de cada órgão, com o cuidado de fotografar as mesmas localizações anatômicas em todas as amostras.

#### 4.13 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO)

Após 48 horas de cultura, 100 µL de sobrenadante de cultura de células peritoneais de cada animal a  $2 \times 10^6$  cels/mL foram colocados nos poços de microplacas de ELISA com fundo chato tipo Corning. O sobrenadante foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente com 100µl do Reativo de Griess (Ding et. al., 1988). Este reativo foi obtido misturando-se a solução A (50 ml de sulfanilamida 1%) com a solução B (50 ml de 0,1% dihidro-cloreto de naftiletlenodiamina diluído a 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 ELISA (TP READER NM). A produção de NO foi quantificada através de comparação com uma curva padrão de Nitrito em concentrações variando de 3,12 a 100 $\mu$ M, sendo os resultados expressos em moles/mL.

#### 4.14 PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada através do método descrito por Pick & Mizel (1981), adaptada por Russo e colaboradores (1989) e modificada como descrita abaixo.

Após terem sido centrifugadas, as células de peritônio foram ressuspensas em meio RPMI contendo 0,05  $\mu$ g/ml de peroxidase e fenol vermelho, sendo que alíquotas de 100 $\mu$ l das suspensões celulares ( $2 \times 10^6$  cels/ml) foram distribuídas em placas (Corning) de 96 cavidades (em triplicata) e estimulados ou não com 10 $\mu$ g/ml de MOG e Concanavalina A (Con A). Após 01 hora de incubação à 37<sup>0</sup>C em estufa de CO<sub>2</sub>, a reação foi interrompida pela adição de 10 $\mu$ l de NaOH 1M às cavidades da placa. Procedeu-se, então, à leitura da absorbância, utilizando-se o filtro de 620 nm com auxílio de leitor automático de ELISA (TP READER NM). A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberada na reação foi calculada à partir de uma solução estoque (30%) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma Co., St. Louis) em concentrações variando de 1 a 50 $\mu$ M, sendo os resultados expressos em moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /  $2 \times 10^5$  células peritoneais.

#### 4.15 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

As células foram cultivadas na densidade de  $2 \times 10^5$ /poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100  $\mu$ g/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 e com concanavalina A (Sigma) a 10 µg/ml. Sobrenadantes foram coletados após 24h e congelados em freezer à -86°C para realização da técnica de ELISA. As Placas de ELISA foram sensibilizadas com um primeiro anticorpo (anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$  e anti-IL-17) (PeProtech Inc, New Jersey), diluídos em PBS e incubadas “*overnight*” a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tween 20 (PBST) por 4x foram e bloqueadas com PBS-Tween 20 (PBST) + 10% BSA, por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e, em seguida, adicionados o padrões (das citocinas citadas anteriormente) (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 biotinilados (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 realizadas e adicionado o conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/400 (SIGMA - Co, St. Louis), seguido de incubação por 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 feita em leitor de ELISA (TP READER NM) 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).

#### 4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados pela média +/- desvio-padrão (GraphPad InStat 3.1<sup>®</sup>). As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes

grupos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para a distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para a determinação das diferenças significativas entre os grupos, com nível de significância ( $p < 0,05$ ).

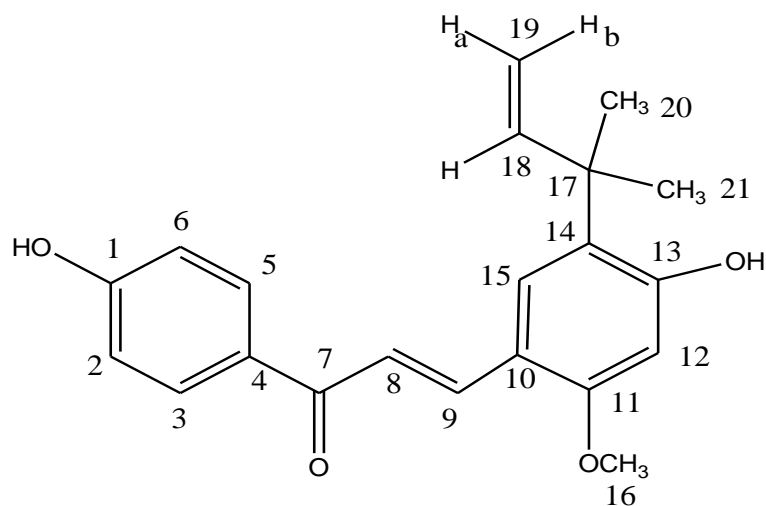
## 5 RESULTADOS

### 5.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LICO A

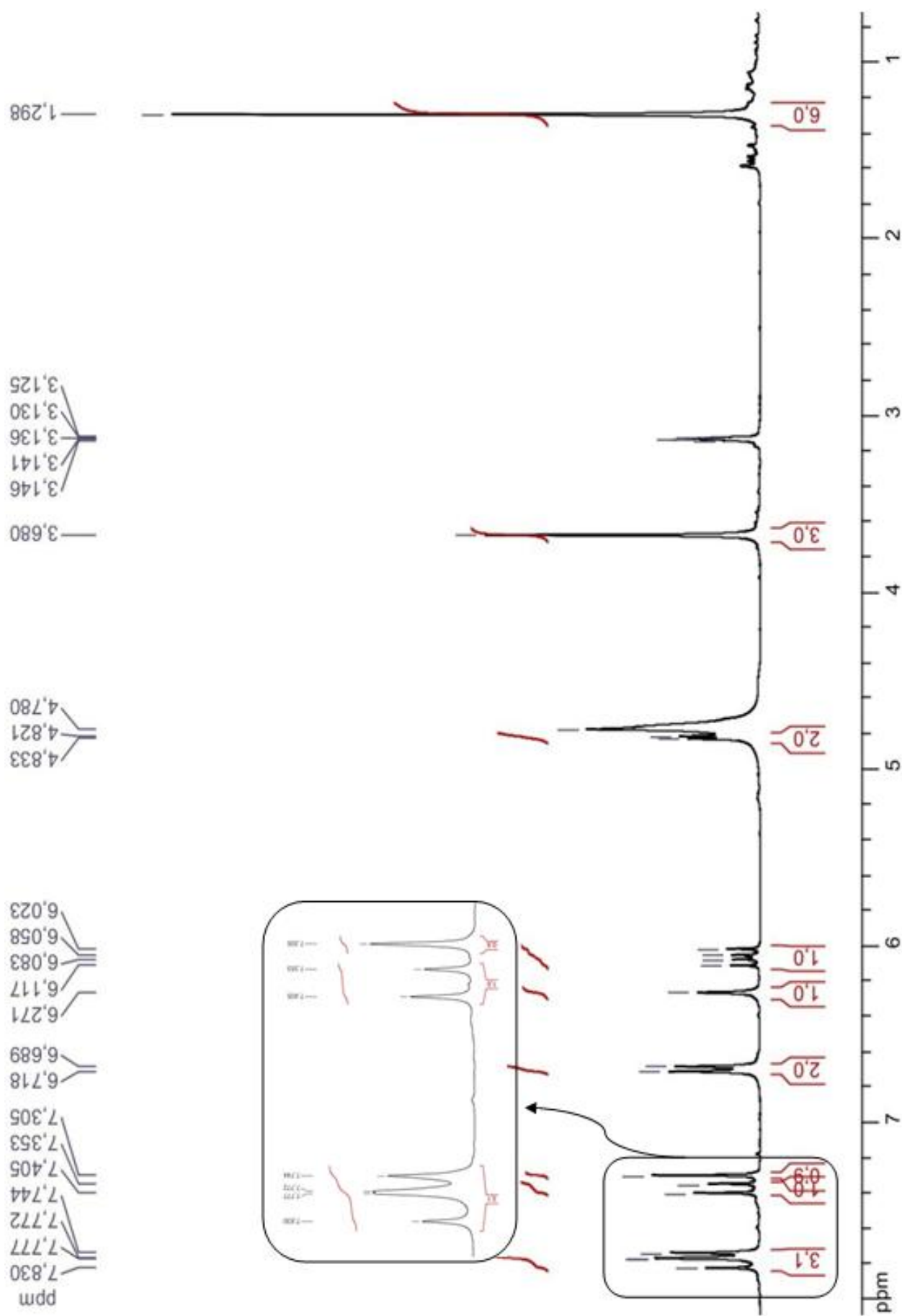
Após o isolamento e purificação, a estrutura química Lico A (Figura 7) foi confirmada por meio da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 8) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 9) e comparação com os dados previamente publicados (WANG et. al., 2004; WON et. al., 2007). Os dados espectroscópicos encontram-se a seguir:

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 1,29 (s, 6H, H20 e H21); 3,68 (s, 3H, H16); 4,82-4,83 (m, 2H, H19a e H19b); 6.02-6,17 (dd, 1H,  $J_{18,19b}=18,0$  Hz e  $J_{18,19a}=10,5$  Hz, H18); 6,27 (s, 1H, H12); 6,69 (d, 2H,  $J_{2,6}=8,7$  Hz); 7,30 (s, 1H, H15); 7,37(d, 1H, H8,  $J_{8,9}=15,6$  Hz); 7,74-7,83 (m, 3H, H3,H5 e H9).

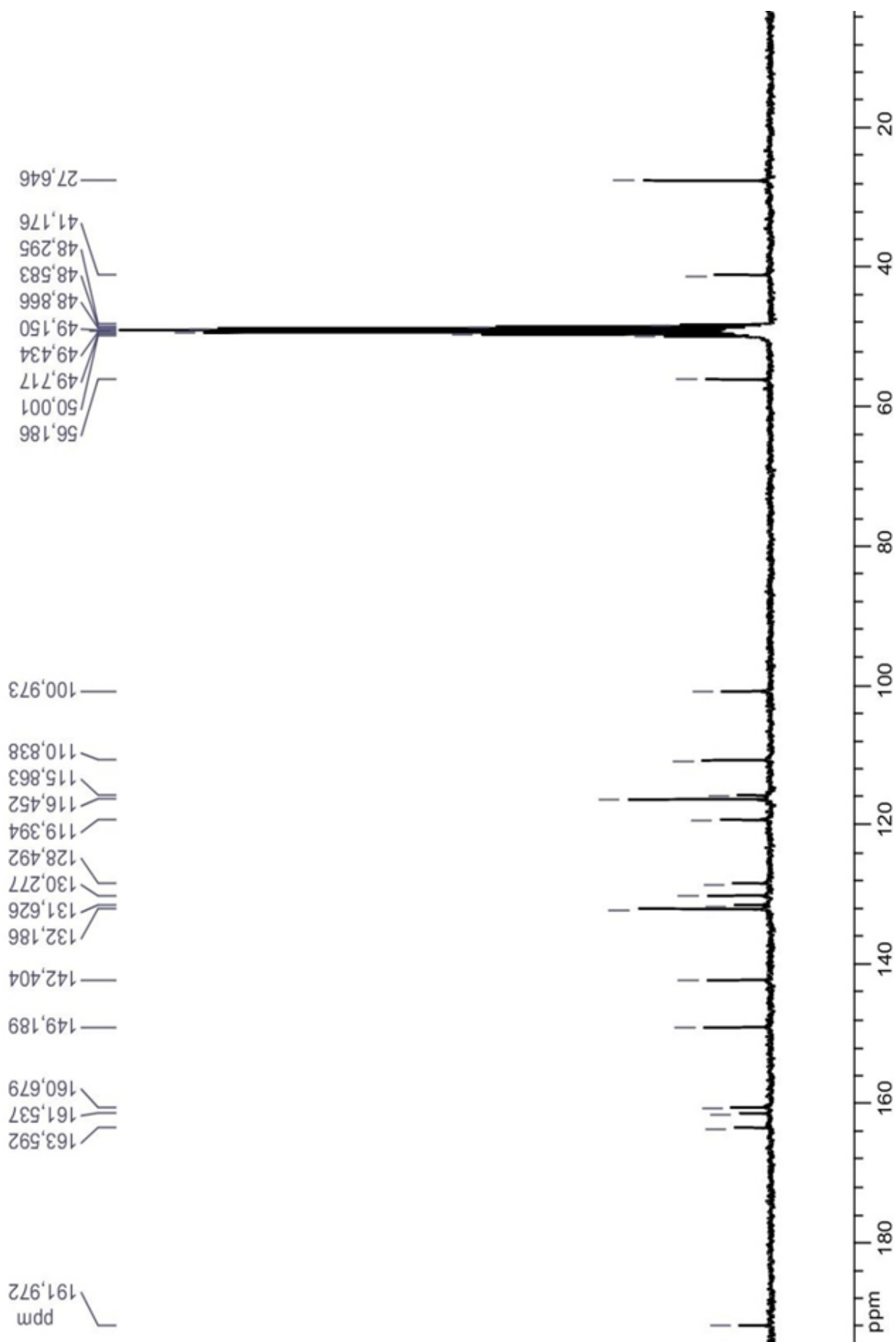
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 27,64 (C20 e C21); 41,18 (C17); 56,18 (C16); 100,97 – 163,59 (carbonos aromáticos e olefínicos); 191,97 (C7).



**Figura 7-** Estrutura química da Lico A com numeração das funções orgânicas para confirmadas por RMN.



**Figura 8-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto Lico A ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz).



**Figura 9** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto Lico A ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz).



## 5. 2 CURSO CLÍNICO DA EAE

Os 30 camundongos utilizados foram acompanhados clinicamente durante todo o experimento. Sendo que, durante a realização do mesmo, os grupos se comportaram de maneira diferente.

Para o grupo controle negativo, foram utilizados 05 camundongos e em nenhum momento foi observado o desenvolvimento de qualquer sinal clínico neurológico da EAE, tais como perda do tônus da cauda (escore1), paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2), paralisia severa dos membros posteriores (escore 3), tetraplegia e animais moribundos (escore 4) ou morte dos animais (escore 5).

Resultado diferente do encontrado no grupo de camundongos induzidos com da EAE, sem tratamento, sendo por isso determinado como grupo controle positivo (Figura 10). Estes começaram a apresentar sintomas da EAE no nono dia após indução (dois animais apresentavam flacidez e atonia de cauda - escore1). O que também foi observado no 10° e 11° dias. Ao 12° dia, observou-se que um animal já apresentava paralisia parcial nos membros posteriores (escore 2) e dois perda no tônus da cauda (escore1). No 13° dia pós-indução, todos os animais pertencentes ao grupo em questão apresentavam sinais clínicos da EAE, desses, três apresentavam perda do tônus da cauda (escore 1), um com paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) e um com paralisia severa dos membros posteriores (escore 3).

Após a avaliação clínica ao 14° dia, foi observado, que os sinais clínicos progrediram, resultando em um animal com perda do tônus da cauda (escore1), dois com paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) e dois com paralisia severa dos membros posteriores (escore 3). Ao 15° dia, um animal evoluiu para a tetraplegia (escore 4), enquanto que, os demais apresentaram clínica estável, sendo, dois apresentando paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) e dois paralisia severa dos membros posteriores (escore 3). Este mesmo quadro se manteve ao 16° dia.

No 17° pós-indução da EAE, quatro animais apresentavam paralisia severa dos membros posteriores (escore 3) e um tetraplegia, quadro esse, que

se repetiu no 18º dia. Ao 19º, um animal já apresentou melhora clínica espontânea, com isso os animais foram sacrificados no 20º dia, a fim de se detectar o máximo dano tecidual e obter o maior título de citocinas. Este fato pode ser visualizado na tabela 6, que representa a média do escore clínico da EAE (grupo controle positivo) no 19º dia e no dia do sacrifício dos animais, ou seja, 20º dia pós-indução.

**Tabela 6.** Média dos escores encontrados nos grupos do experimento no 19º e 20º dia pós indução de EAE.

19º DIA PÓS INDUÇÃO		20º DIA PÓS INDUÇÃO	
Grupos	Escore Médio	Grupos	Escore Médio
EAE	3,2	EAE	3,0
EAE + Lico A-15 mg/Kg/dia	2,6	EAE + Lico A-15 mg/Kg/dia	2,6
EAE + Lico A-30 mg/Kg/dia	1,6	EAE + Lico A-30 mg/Kg/dia	1,6
EAE + <i>trans</i> -cariofileno-25 mg/Kg/dia	2,0	EAE + <i>trans</i> -cariofileno-25 mg/Kg/dia	2,0
EAE + <i>trans</i> -cariofileno-50 mg/Kg/dia	0,8	EAE + <i>trans</i> -cariofileno-50 mg/Kg/dia	0,8

Os tratamentos com a Lico A nas doses de 15 mg/Kg e 30 mg/Kg, assim como os tratamentos com o *trans*-cariofileno nas doses 25 mg/kg e 50 mg/kg, só começaram a ser administrados por via oral, à partir do 10º dia, devido ao fato de que quatro dos cinco grupos inoculados com MOG<sub>55-35</sub> /CFA já apresentavam sintomas da EAE (80%).

No grupo de camundongos induzidos com a EAE e tratados com 15 mg/Kg/dia de Lico A por via oral (n=05) (Figura 10), os animais também apresentaram sintomas clínicos de EAE no 9º dia pós indução. No 10º dia pós-indução, dois dos cinco animais já apresentavam perda no tônus da cauda (escore 1), com a evolução de um desses no 11º para paralisia parcial dos

membros posteriores (escore 2). Sendo que, no 12º dia, esse mesmo animal já apresentava paralisia severa dos membros posteriores (escore 3), e entre os demais, a evolução clínica também foi observada, onde um evoluiu para paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) e outro apresentou perda no tônus da cauda (escore 1). Ao 13º dia foi observado a rápida evolução de um animal que anteriormente apresentava paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) a um estado de tetraplegia (escore 4), em contrapartida, houve estabilização clínica dos demais, considerando que um apresentava paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) e outro perda no tônus da cauda (escore 1), como o observado no dia anterior.

Fato esse que, se repetiu no 15º dia pós-indução. No 16º dia, mais um animal do grupo evoluiu para um quadro de paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2). Em relação aos demais, dois apresentavam paralisia severa dos membros posteriores (escore 3) e um tetraplegia (escore 4). No 17º dia, todos os animais do grupo já apresentavam sinais clínicos de EAE, porém houve uma estabilização dos sinais clínicos, com isso, foi observado neste grupo um animal com perda no tônus da cauda (escore 1), um com paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2), dois com paralisia severa dos membros posteriores (escore 3) e um com tetraplegia (escore 4). Os sinais clínicos da EAE que foram observados no 17º dia, mantiveram-se os mesmos no 18º, 19º e 20º dia, indicando assim uma estabilização clínica. Observamos na tabela 6 a avaliação clínica dos animais pertencentes a esse grupo no 19º dia e no dia do sacrifício (20º dia pós-indução).

Podemos notar (Figura 10) que em nenhum ponto deste grupo ocorreram diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle positivo (EAE) e este tratamento.

Resultado diferente foi encontrado no grupo de camundongos C57BL/6 com a EAE e tratados com 30 mg/Kg/dia de Lico A por via oral (n= 05) (figura 9) onde os primeiros sinais clínicos também foram observados no 9º dia. Neste momento, um animal apresentando flacidez e atonia de cauda (escore 1). Fato esse, que ocorreu também entre o 10º ao 13º dia. No 14º, apenas o animal que já apresentava sinais clínicos evoluiu para um quadro de paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2). Porém, no 15º, dois animais apresentavam

sinais clínicos, um com perda no tônus da cauda (escore 1) e outro com paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2).

Na avaliação realizada no 16º dia, foi observado que quatro dos 5 animais do grupo em questão apresentavam sinais clínicos de EAE, sendo dois com perda do tônus da cauda (escore 1) e dois com paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2). Já ao 17º dia, os quatro animais com sinais clínicos apresentavam paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2). Assim como o encontrado no grupo tratado com Lico A 15mg/Kg/dia, também ocorreu uma estabilização da clínica observada nos animais entre o 17º dia e o 19º dia após a indução, com os quatro animais apresentando paralisia parcial dos membros posteriores. A tabela 6 mostra da avaliação clínica dos animais pertencentes a este grupo no 19º dia e no dia do sacrifício, (20º dia após a indução).

Com isso, observamos que a partir do 15º dia, o tratamento com a Lico A na maior dose apresentou diferença significativa entre a média dos escores clínicos deste grupo e o controle positivo ( $p < 0,05$ ). Fato esse, que se manteve até o dia do sacrifício (20º dia). Apresentando os seus valores de escores clínicos sempre próximos à metade dos animais pertencentes ao controle positivo, além de retardar o desenvolvimento dos sinais clínicos em relação ao grupo EAE (figura 10).

Apesar do grupo de camundongos C57BL/6 com a EAE e tratados com 25 mg/Kg/dia de *trans*-cariofileno por via oral ( $n = 05$ ), divergirem na substância de tratamento, os resultados encontrado foram semelhantes aos dos grupos tratados com a Lico A na menor dose. Logo, o início dos sinais clínicos ocorreram no 10º dia, com um animal apresentando perda no tônus da cauda (escore 1). O mesmo foi observado no 11º dia nesse grupo. Contudo, na avaliação realizada no 12º, observou-se que o animal apresentava paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2). A evolução clínica desse animal também foi observada no 13º, tendo em vista que, esse já apresentava paralisia severa dos membros posteriores (escore 3).

No 14º, apesar da estabilização do animal que apresentava sinais clínicos da EAE, permanecendo então, com paralisia severa dos membros posteriores (escore 3), outro animal apresentou sintomas, com perda do tônus

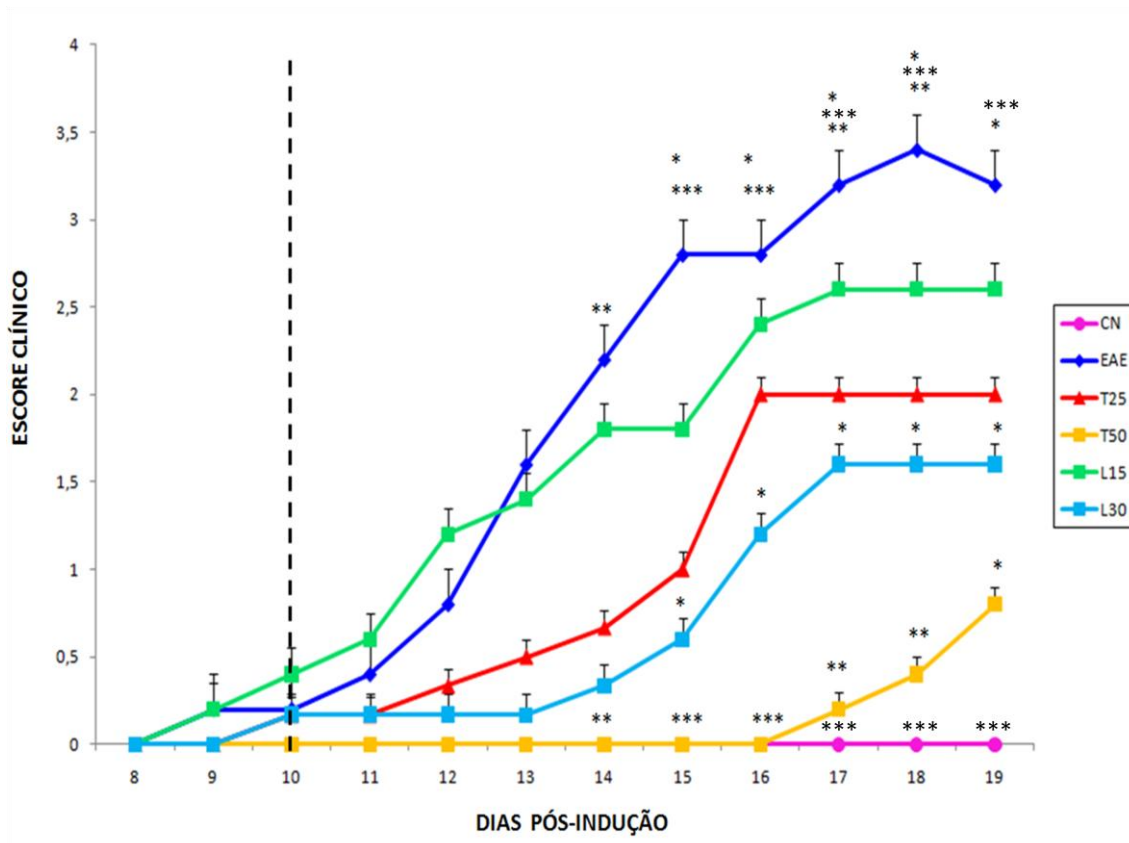
da cauda (escore 1). Com a chegada da doença ao 15º dia, após a avaliação, percebeu-se que um animal apresentava evolução clínica, com paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2), enquanto o outro permaneceu estável com paralisia severa dos membros posteriores (escore 3).

Já ao 16º dia, quatro dos cinco animais do grupo apresentavam sinais clínicos da EAE, desses, três apresentavam paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) e o outro apresentou paralisia severa dos membros posteriores (escore 3), como no dia anterior. Nos dias seguintes, ou seja, do 17º ao 19º dia, ocorreu uma estabilização dos sinais clínicos observados até o dia do sacrifício nestes animais (as avaliações clínicas médias do grupo nos 19º e 20º dias se encontram na tabela 6), com dois animais apresentando paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) e dois com paralisia severa dos membros posteriores (escore 3) (Figura 10).

O resultado encontrado nos animais doentes e tratados com o *trans*-cariofileno na dose de 50 mg/Kg/dia via oral foi completamente diferente do encontrado no grupo tratado com a mesma substância na menor dose. Os animais só apresentaram sinais clínicos tardiamente (no 17º dia pós-indução), com perda no tônus da cauda (escore 1) de um animal. No 18º dia, o grupo apresentava dois animais com perda no tônus da cauda (escore 1). E no 19º, dois animais apresentavam perda no tônus da cauda e um com paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2), resultados que se mostraram estáveis no dia do sacrifício (Figura 10). Na tabela 6, encontram-se os dados referentes ao 19º e 20º dia pós-indução.

Portanto, neste grupo, tivemos um grande retardo no aparecimento de sintomas clínicos e os animais que o apresentaram estavam em baixo escore clínico. Resultado este que foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo doente sem tratamento (controle positivo) ( $p < 0,01$ ).

A figura 10 mostra a evolução do escore clínico dos animais com EAE e dos animais com EAE que foram tratados com Lico A nas doses de 15mg/Kg/dia e 30mg/Kg/ dia, e *trans*-cariofileno nas doses de 25mg/kg/dia e 50mg/Kg/dia durante os 19 dias de evolução da fase aguda da doença.



**Figura 10: Cinética da avaliação do efeito da Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e do *trans*-cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) sobre a média dos escore clínicos em camundongos C57BL/6 com a EAE 20 dias pós indução.**

N=5 animais /grupo. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão por grupo. \* $p < 0,05$  entre o grupo EAE e EAE + *trans*-cariofileno 50mg/Kg/dia e entre EAE e EAE + Lico A 30 mg/Kg/dia, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  entre EAE e EAE + *trans*-cariofileno 50mg/Kg/dia; \*\*\* $p < 0,001$  entre o grupo CN (controle negativo) e o grupo EAE.

┆ Início do tratamento com as substâncias testadas.

### 5.3 ACOMPANHAMENTO DO PESO

Os 30 animais foram submetidos a pesagens ao longo do tratamento, no intuito de se obter além dos escores clínicos mais um parâmetro para avaliação. Embora, nos dois primeiros dias após a indução todos os animais tenham apresentado perda de peso, este fato ocorre devido ao estresse ao qual são submetidos, pelo manuseio e aplicação das soluções indutoras nos mesmos, o peso foi recuperado nos dias seguintes, ocorrendo, em geral, ganho de peso até o aparecimento dos sinais clínicos (9º dia após a indução). Porém, com o desenvolvimento dos sinais clínicos, mais uma vez, foi observado diferença de resultados entre os grupos.

No grupo controle negativo os animais permaneceram com o peso corporal relativamente constante (próximo a 22,5g) apresentando pequenas variações. Já no grupo de animais onde foi feita a indução da EAE e não foi administrado nenhum tipo de tratamento, a queda de peso corporal foi muito acentuada, principalmente após o 10º dia, um dia após o início dos sinais clínicos. A perda de peso ocorreu de maneira crescente, com o desenvolvimento dos sinais clínicos. Pode ser observado na figura 11 que a partir do 14º dia esta perda de peso no grupo controle positivo (EAE) foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle negativo. Onde, no dia do aparecimento dos sinais clínicos a média de peso corporal dos cinco animais pertencentes ao grupo, era de 21,83g, enquanto que, no 17º dia pós-indução a média foi de 18,00g. Já no 18º e 19º ocorreu um discreto ganho de peso.

Resultados similares foram encontrados pelos animais com a EAE e tratados com a Lico A nas dosagens de 15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia por via oral, onde a queda de peso corporal começaram a ocorrer no 11º dia, onde a média dos pesos eram de 21,34g e 21,54g, respectivamente. Nestes animais as perdas de pesos foram crescentes e acompanharam a cinética do grupo controle positivo, chegando a valores próximos de 18g no 19º dia para ambos os grupos (Figura11).

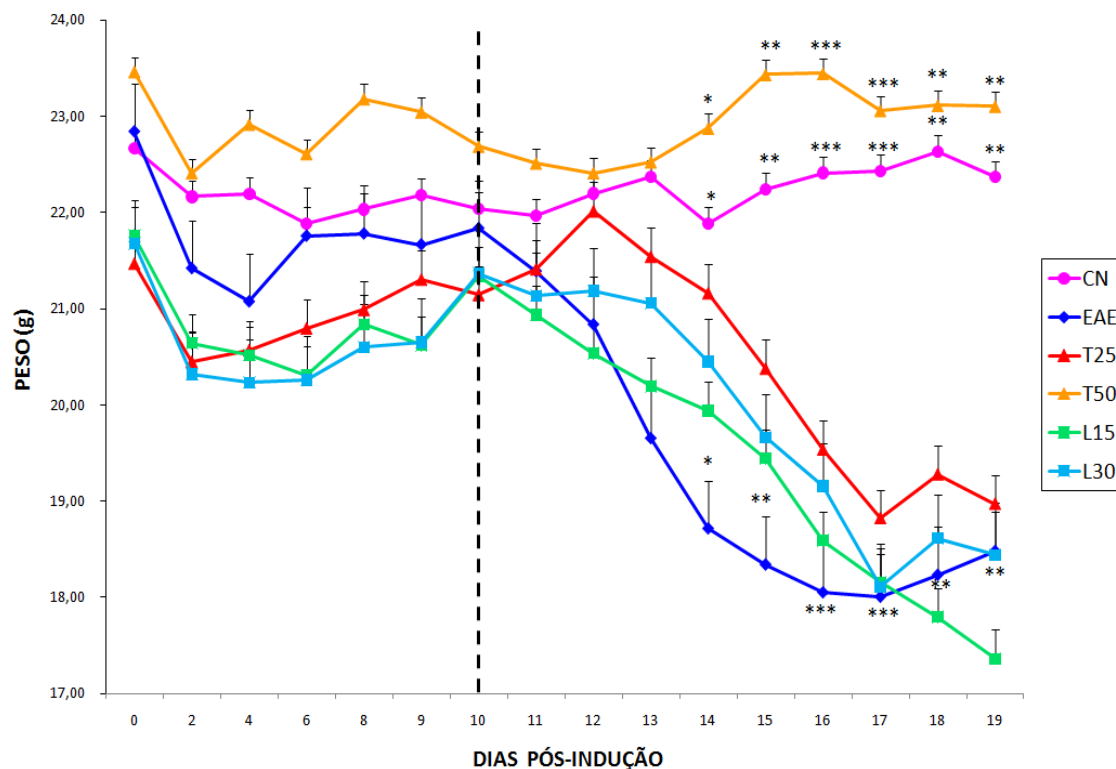
Através da pesagem dos animais doentes e tratados com *trans*-cariofileno na dose de 25mg/kg/dia via oral, percebeu-se que, apesar dos sinais clínicos aparecerem no 10° dia (média de peso de 21,14g), não houve perda de peso, mas sim ganho. Fato esse, que ocorreu entre o 10° e 12° dia após a indução. Porém, do 12° dia até o 17° dia os animais apresentaram perda de peso (médias de 22,02 e 18,82 respectivamente). Ocorrendo também, cinética semelhante ao grupo controle positivo nesse caso, discreto ganho de peso no 18° (Média de 19,28g), com posterior decréscimo no 19°(média de 18,97g).

O resultado encontrado nos animais com a EAE e tratados por via oral com 50mg/Kg/dia de *trans*-cariofileno (Figura 11) foi completamente diferente aos demais. Através da pesagem realizada, foi observado que os animais desse grupo mantiveram seus pesos na maior parte do período do experimento, observando uma pequena e não significativa queda de peso entre os dias 9 e 13 após a indução quando comparado ao controle positivo. Vale ressaltar o ganho de peso entre os dias 13 (média de 22,53g) e 15 (média de 23,43g) após a indução da EAE, havendo a manutenção no 16° dia (média de 23,45g). Ao 17° dia; quando começam a aparecer os sintomas, os animais tiveram leve redução do peso para 23,06g (média), com estabilização de seus pesos corporais no 18° dia (média de 23,11g) e 19° dia (média de 23,10g), apesar da discreta evolução clínica dos animais pertencentes a esse grupo.

Portanto, fica claro que neste grupo os pesos dos animais ficaram muito próximos aos pertencentes ao grupo controle negativo. E semelhante ao grupo controle negativo, estes apresentaram resultados estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle positivo (doente), desde o 14° dia após a indução até o sacrifício ( $p < 0,01$ ).

A figura 11 demonstra a variação da média de perda de peso encontrada nos animais com EAE e dos animais com a EAE que foram tratados com a Lico A nas dosagens de 15mg/Kg/dia e 30mg/Kg/dia, e o *trans*-cariofileno nas dosagens de 25mg/kg/dia e 50mg/Kg/dia durante os 19 dias de evolução da doença.





**Figura 11: Avaliação do efeito da Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e do *trans*-cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na variação de peso em camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.**

N=5 animais /grupo. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão por grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  entre EAE e EAE + *trans*-cariofileno 50mg/Kg/dia e EAE e Controle negativo.

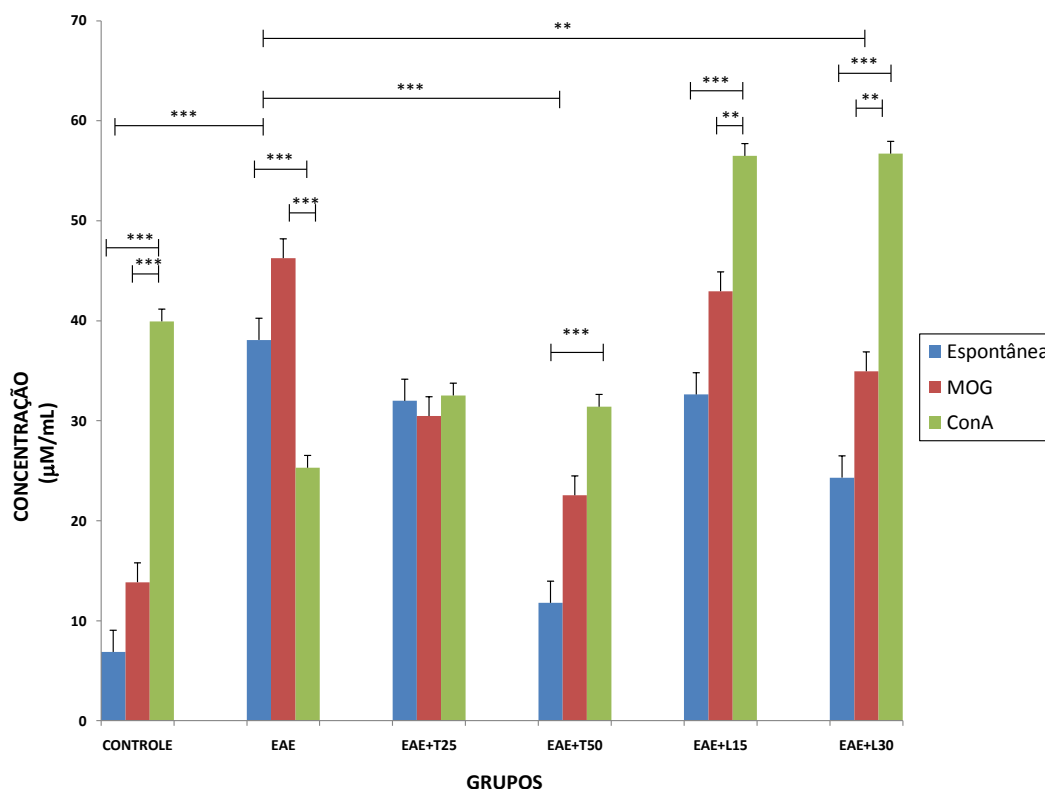
--- Início do tratamento com as substâncias testadas.

## 5.4 PRODUÇÃO DE NO

A produção do NO em sobrenadante das culturas de células peritoneais (Figura 12) mostra que os animais pertencentes ao controle negativo apresentaram baixos níveis de nitrito, valor médio de 7  $\mu\text{Mol/mL}$ , isso, quando comparado ao valor encontrado nos animais com a EAE (aproximadamente 38  $\mu\text{Mol/mL}$ ) ( $p < 0,001$ ). Resultado semelhante, foi o encontrado nos grupo EAE e tratado com a Lico A na dosagem de 15 mg/Kg/dia e *trans*-cariofileno 25mg/Kg/dia, onde os níveis encontrados foram de aproximadamente 32  $\mu\text{Mol/mL}$  em ambos, mostrando uma elevada produção como nos animais doentes.

Porém, nos animais tratados com a Lico A e o *trans*-cariofileno nas maiores doses (30mg/Kg e 50mg/Kg, respectivamente), os níveis de NO foram estatisticamente menores quando comparados aos animais com a EAE. Onde no tratamento com a Lico A a produção de NO foi de 24  $\mu\text{Mol/mL}$  ( $p < 0,05$ ) e 12  $\mu\text{Mol/mL}$  ( $p < 0,01$ ) para o *trans*-cariofileno.

Foi avaliada também a produção de NO nas células peritoneais sobre o estímulo de Con A e MOG<sub>35-55</sub>. Neste caso, foi observado que a produção foi maior que a espontânea pela Con A nos grupos controle negativo ( $p < 0,01$ ), EAE + T50 ( $p < 0,05$ ), EAE + L15 ( $p < 0,05$ ) e EAE + L30 ( $p < 0,01$ ). No que se refere ao estímulo com a MOG, esta foi maior que a espontânea nos grupos EAE ( $p < 0,05$ ) (Figura 12). Contudo, no grupo controle também foi observado que a produção pelas células estimulada com Con A, também foi maior que as estimuladas com MOG ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12: Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o *trans*-cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de NO em sobrenadante de culturas de células peritoneais de camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.**

N=5 animais /grupo; Os dados estão apresentados em média + desvio padrão.

Entre os grupos:

\*\* $p < 0,01$ - no grupo EAE comparado com EAE + L30.

\*\*\* $p < 0,001$ - grupo EAE comparado com controle e EAE + T50.

Inter grupos:

Controle negativo: \*\*\*  $p < 0,001$ - Estimulo Con A comparado tanto com MOG quanto com espontânea. EAE: \*\*\*  $p < 0,001$ - Produção espontânea comparada a estimulada com Con A; Produção estimulada com MOG comparada a Con A.

EAE + T50: \*\*\*  $p < 0,001$ - Estimulo Con A comparado com espontânea.

EAE + L15: \*\*\*  $p < 0,001$ - Estimulo Con A comparado com espontânea e

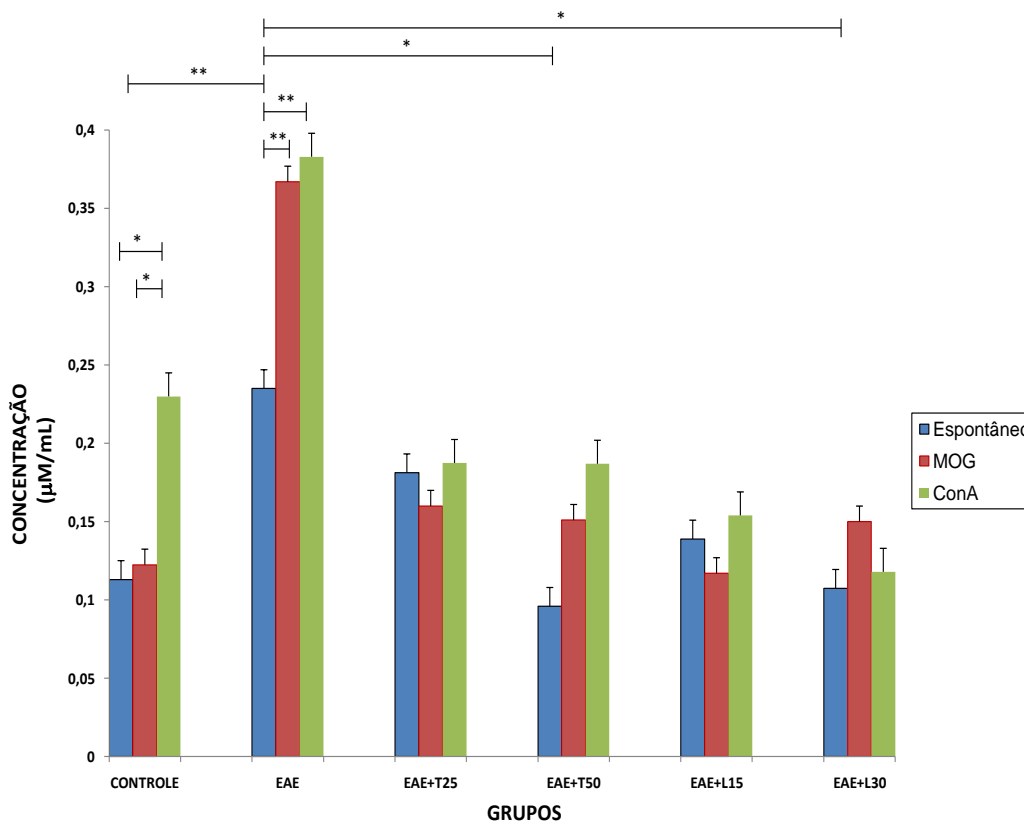
\*\* $p < 0,01$ - Produção espontânea comparada com MOG. EAE + L30: Estimulo Con A comparado tanto com MOG quanto com espontânea.

## 5.5 PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Assim como na produção de NO, a produção espontânea de peróxido de hidrogênio pelas células do exudato peritoneal foi maior no grupo EAE, sendo esta estatisticamente diferente ao grupo controle negativo ( $p < 0,01$ ). Os grupos tratados com o *trans*-cariofileno na dosagem de 25 mg/Kg/dia e Lico A 15mg/Kg/dia, não apresentaram diferença estatística significativa ao grupo EAE.

Porém, o grupo tratado com a Lico A 30 mg/Kg/dia e o grupo tratado com o *trans*-cariofileno na dose de 50mg/Kg/dia, apresentaram diferença significativa em relação a produção do grupo EAE ( $p < 0,01$ ), já que os níveis encontrados nos grupos que receberam estes tratamentos, nas doses citadas, foram muito baixos quando comparadas a produção no grupo EAE (Figura 13). Vale notar, que nos grupos que receberam tratamento não apresentaram diferenças significativas com o grupo controle.

Nas células do exudato peritoneal estimuladas com concanavalina A (Con A), a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi maior (estatisticamente significativa) que a produção espontânea apenas nos grupos controle negativo e EAE. Já o estímulo com a MOG foi estatisticamente maior que a espontânea apenas no grupo EAE (Figura13).



**Figura 13: Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o *trans*-cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sobrenadante de culturas de células peritoneais camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.**

N=5 animais /grupo; Os dados estão apresentados em média + desvio padrão.

Entre os grupos:

\*p<0,05- no grupo EAE comparado com EAE + L30 e EAE + T50.

\*\*p<0,01- grupo EAE comparado com controle negativo.

Inter grupos:

Controle negativo: \* p<0,05- Estimulo Con A comparado tanto com MOG quanto com espontânea.

EAE: \*\* p<0,001- Produção espontânea comparada a estimulada com MOG; Produção espontânea comparada Con A.

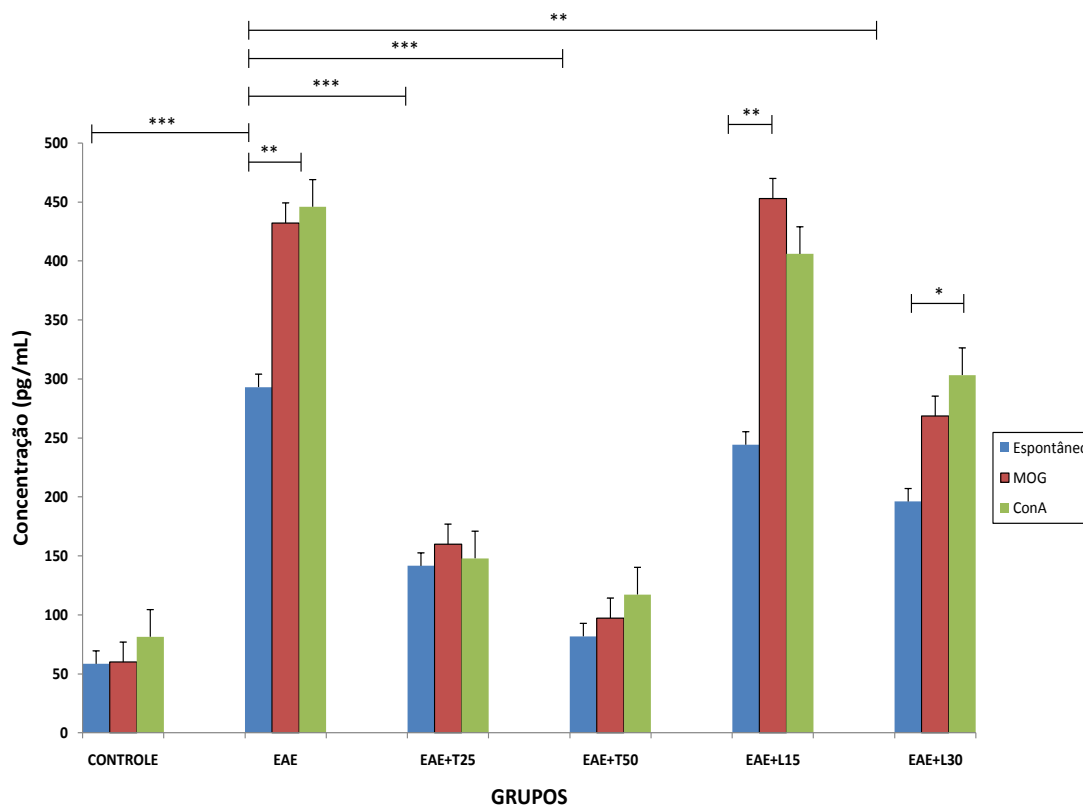
## 5.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE ESPLÊNOCITOS DOS CAMUNDONGOS C57BL/6 INDUZIDOS DA EAE E TRATADOS COM A LICO A E O *TRANS*-CARIOFILENO

### 5.6.1 Interferon-gama

A citocina IFN- $\gamma$  foi determinada em sobrenadante de cultura de células do baço. Em relação à produção espontânea foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (119,5 pg/mL) e o grupo EAE (826 pg/mL) ( $p < 0,001$ ), assim como entre o grupo EAE e o grupo de animais induzidos e tratados com a Lico A na dose de 30mg/kg/dia e o *trans*-cariofileno nas duas doses testadas.

O nível encontrado foi de, aproximadamente, 559 pg/mL no grupo tratado com 30 mg/Kg/ dia de Lico A ( $p < 0,01$ ). Nos grupos tratados com o *trans*-cariofileno nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia, os níveis detectados foram de 385,5 pg/mL ( $p < 0,001$ ) e 119 ng/mL ( $p < 0,001$ ), respectivamente (Figura 14).

Em relação aos estímulos com MOG e Con A, a produção encontrada apresentou diferença significativa entre nos grupos EAE, EAE + L15 e EAE + L30 em relação a produção espontânea e a produção frente aos estímulos com Con A, MOG e Con A, respectivamente, como mostrado na figura 14.



**Figura 14: Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o *trans*-cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.**

N=5 animais /grupo; Os dados estão apresentados em média + desvio padrão.

Entre os grupos:

\*\* $p < 0,01$ - no grupo EAE comparado com EAE + L30.

\*\*\* $p < 0,001$ - grupo EAE comparado com controle negativo, EAE + T25 e EAE + T50.

Inter grupos:

EAE: \*\*  $p < 0,05$ - Estimulo Con A comparado com espontânea.

EAE + L15: \*\*  $p < 0,05$ - Estimulo MOG comparado com espontânea

EAE + L30: \*  $p < 0,05$ - Estimulo Con A comparado com espontânea.

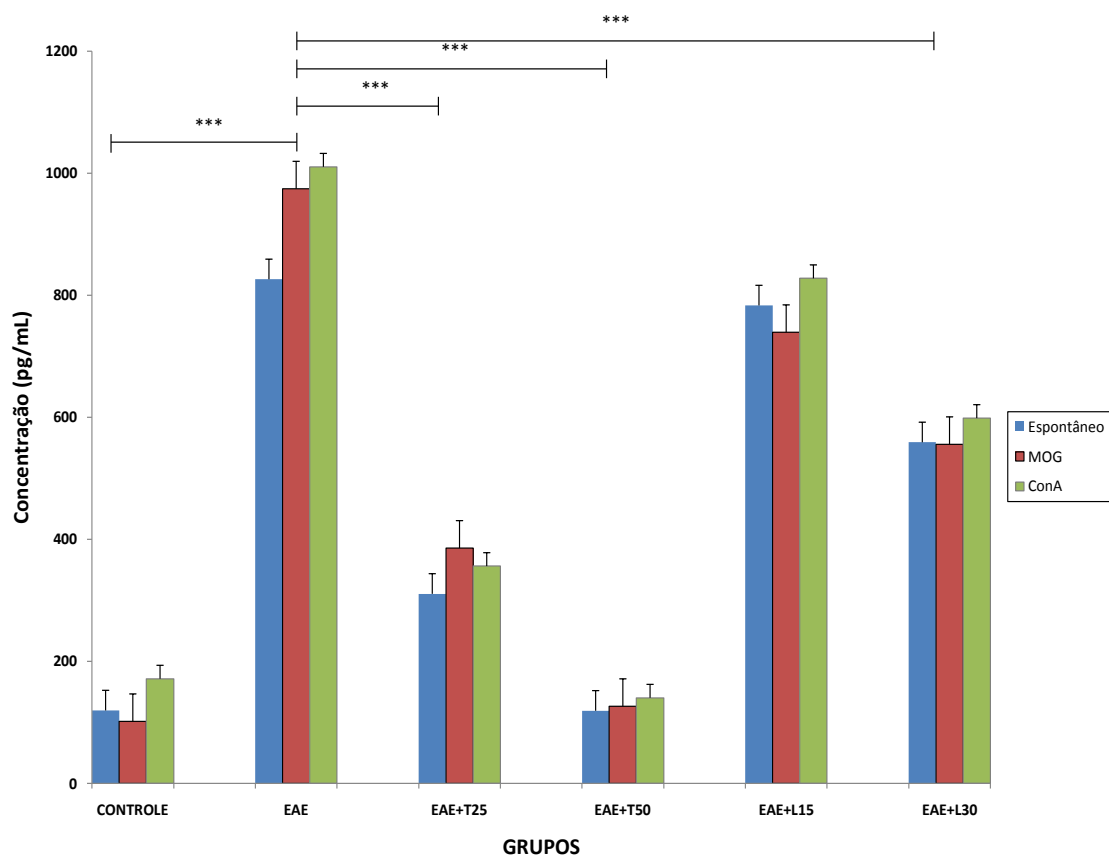
### 5.6.2 Fator de Necrose Tumoral-alfa

A citocina TNF- $\alpha$  foi determinada no sobrenadante da cultura de células do baço e em relação à produção espontânea, foi observada diferença estatística significativa entre o grupo controle (42 pg/mL) e o grupo EAE (407 pg/mL) ( $p < 0,001$ ), assim como entre o grupo EAE e o grupo com animais induzidos e tratados com a Lico A na dose de 30mg/Kg e com o *trans*-cariofileno nas duas doses testadas.

Os níveis encontrados foram de, aproximadamente, 291 pg/mL no grupo tratado com 15mg/kg/dia de Lico A ( $p < 0,01$ ), 181 pg/mL no grupo tratado com Lico A com 30 mg/Kg/ dia ( $p < 0,001$ ) e nos grupos tratados com *trans*-cariofileno nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia, os níveis detectados foram de 88 pg/mL ( $p < 0,001$ ) e 55 pg/mL ( $p < 0,001$ ) respectivamente (Figura 15).

Em relação aos estímulos com MOG e Con A, a produção encontrada não apresentou diferença significativa entre a produção espontânea no grupo e a produção frente aos estímulos.





**Figura 15: Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o *trans*-cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.**

N=5 animais /grupo; Os dados estão apresentados em média + desvio padrão.

Entre os grupos:

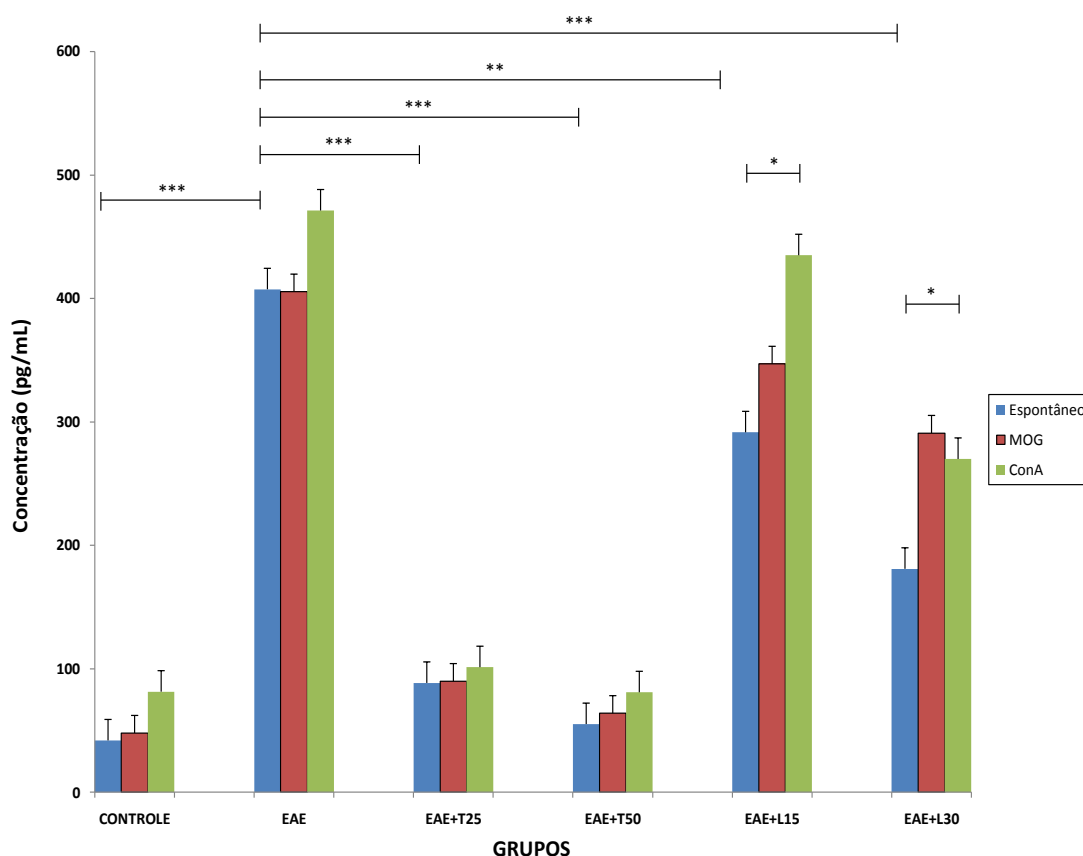
\*\*\* $p < 0,001$ - grupo EAE comparado com controle negativo, EAE + T25, EAE + T50 e EAE + L30.

### 5.6.3 Interleucina 17

A IL-17 foi determinada no sobrenadante da cultura de células do baço por ELISA. Em relação à produção espontânea, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle negativo (42 pg/mL) e o grupo EAE (407 pg/mL) ( $p < 0,001$ ), assim como entre o grupo EAE e o grupo com animais induzidos e tratados todas as doses testadas de Lico A e *trans*-cariofileno.

O nível encontrado foi de, aproximadamente, 291 pg/mL no grupo tratado com 15mg/kg/dia de Lico A ( $p < 0,01$ ) 181 pg/mL. No grupo tratado com Lico A com 30 mg/Kg/dia ( $p < 0,001$ ). Nos grupos tratados com *trans*-cariofileno nas dosagens de 25 e 50 mg/Kg/dia, os níveis detectados foram de 88 pg/mL ( $p < 0,001$ ) e 55 pg/mL ( $p < 0,001$ ) respectivamente (figura 16).

Em relação aos estímulos com MOG e Con A, a produção encontrada apresentou diferença significativa entre a produção espontânea no grupo e a produção frente ao estímulo com Con A nos grupos EAE + L15 e EAE+ L30.



**Figura 16: Efeito do tratamento com a Lico A (15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia) e o *trans*-cariofileno (25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia) na produção de IL-17 em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 com EAE 20 dias pós indução.**

N=5 animais /grupo; Os dados estão apresentados em média + desvio padrão.

Entre os grupos:

\*\* $p < 0,01$ - no grupo EAE comparado com EAE + L15.

\*\*\* $p < 0,001$ - grupo EAE comparado com controle negativo, EAE + T25, EAE + T50 e EAE + L30.

Inter grupos:

EAE + L15: \*  $p < 0,05$ - Estimulo Con A comparado com espontânea.

EAE + L30: \*  $p < 0,05$ - Estimulo Con A comparado com espontânea.

## 5.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE AMOSTRAS DO SNC PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM LICO A E *TRANS*-CARIOFILENO

A análise histológica das amostras da substância branca de todos os órgãos analisados do grupo controle, corados por HE, revelou características compatíveis com as descritas na literatura (AARESTRUP, 2012; ADZEMOVIC et. al., 2013).

A análise do córtex da medula espinhal do grupo controle negativo, corados por HE, evidenciou grande emaranhado de prolongamentos celulares gliais e provenientes de corpos de neurônios das áreas corticais, assim como o comumente encontrado em neurópilo típico. Difusos no neurópilo foram observados núcleos de células da neuroglia, com morfologias sugestivas de astrócitos e oligodendrócitos, intensamente basófilos e com halo perinuclear em decorrência da vacuolização citoplasmática típica de artefatos do processamento histológico. Na extensão dos cortes não foi observada com frequência estruturas celularidade microglial significativa ao contrário das demais amostras do experimento (figuras 17a, 18a e 19a).

Em contraste, a observação das amostras de medula espinhal do grupo EAE, coradas por HE, apresentam diversas áreas corticais e da substância branca com intenso infiltrado inflamatório perivascular, composto predominantemente por células mononucleares, com citoplasma escasso e núcleos redondos intensamente basofílicos, sugerindo população linfocitária, associado a este, acúmulo de células com núcleo fusiforme sugestivas de micróglia (figura 17b). Nos cortes de cérebro, foi observada menor quantidade de fibras mielínicas, principalmente na substância branca do encéfalo, bem como, destacada desorganização do arranjo fibrilar e maior quantidade de células com morfologia sugestiva astrocitária em comparação com o encontrado no grupo controle (figura 18b).

Nas amostras de medula espinhal do grupo EAE tratado com Lico A na dose de 15 mg/Kg, a análise revelou a presença de capilares sanguíneos circundados por infiltrado inflamatório, predominantemente linfocitário. Nestas

amostras, destacou-se a presença de inflamação perivascular na subaracnoidea (figura 17c). Nos cortes do encéfalo, em áreas de substância cinzenta, foram observadas áreas de maior celularidade glial no córtex, enquanto na substância branca, menor quantidade de fibras mielínicas se encontrava em meio a áreas de desarranjo fibrilar, em comparação com as amostras do grupo controle negativo (figura 18c).

Na medula espinhal do grupo tratado com Lico A na dose de 30 mg/Kg, foram observadas áreas de substância cinzenta compatíveis com a normalidade. Na substância branca as áreas tipicamente mielinizadas também foram compatíveis com a normalidade tanto em quantidade, quanto em estruturação assim como a celularidade glial. Porém, destaca-se que em alguns pontos foram observados infiltrado inflamatório mononuclear disperso (figura 17d). Resultado semelhante foi observado na substância branca do encéfalo (figura 18d), onde foram visualizados discretos acúmulos de leucócitos mononucleares.

Em ambos os grupos tratados com Lico A, as características histopatológicas inflamatórias (vasodilatação, estase, migração leucocitária) foram observadas principalmente na medula espinhal, sendo que na maioria das regiões observadas, o infiltrado se localizava focal, perivascular e em diapedese dos capilares que percorrem o tecido nervoso a partir das meninges. Notou-se também, nas amostras provenientes dos animais tratados com a Lico A alterações sugestivas de degeneração hialina e/ou apoptose neuroal, bem como aspecto vacuolado periaxonal em áreas subcorticais e periventriculares.

Nos animais que foram tratados com *trans*-cariofileno na dosagem de 25mg/kg/dia, a análise das amostras de medula espinhal revelou que a substância cinzenta apresentava leve aumento na celularidade glial. Na substância branca, não foram visualizadas áreas de inflamação perivascular subaracnoidea como descrito anteriormente no grupo tratado com a Lico A na dose de 15 mg/Kg, em que os cortes histológicos apresentavam regiões ricas em fibras mielínicas com estrutura bem organizada (figura 17e).

Porém, a avaliação das amostras encefálicas pertencentes ao grupo tratado com 25mg de *trans*-cariofileno, revelou na extensão da substância cinzenta áreas de infiltrado inflamatório perivascular mononuclear, sem

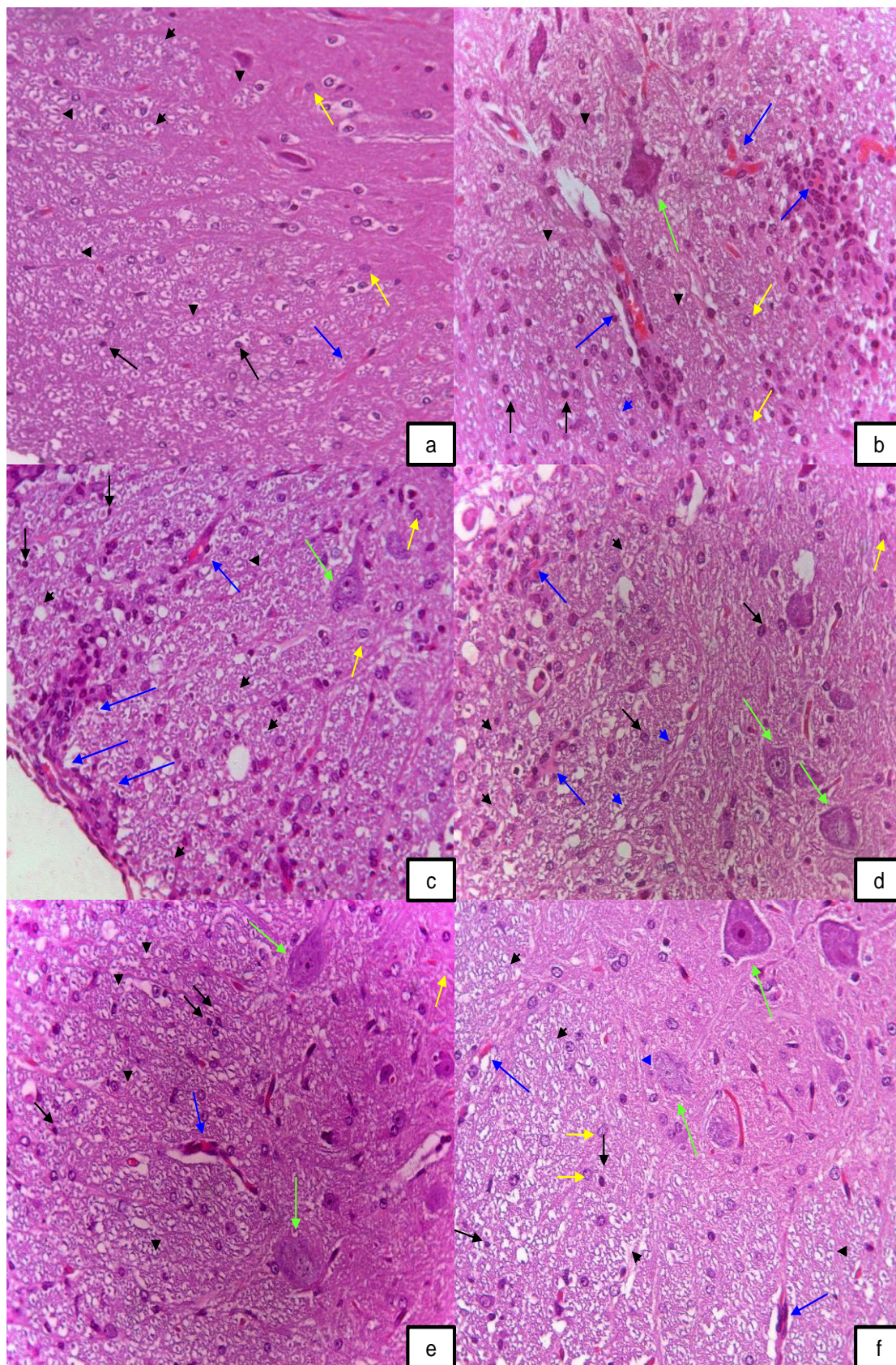
celularidade sugestiva de micróglia. Na substância branca as amostras apresentavam áreas com pouca mielinização, desorganização do arranjo fibrilar, áreas de reação inflamatória difusa associada a aumento da população glial (figura 18e). Ainda no referido grupo, no cerebelo, a camada granulosa das amostras dos animais tratado com o dosagem de 25mg/Kg/dia de *trans*-cariofileno, apresentavam menor celularidade em relação a mesma área dos demais grupos, assim como discreta perda de mielina na substância branca (figura 19e).

Na avaliação histopatológica da substância branca de todas as amostras do grupo tratado com *trans*-cariofileno na dose de 50mg/Kg foi observada grande quantidade de fibras mielínicas, bem organizadas, em orientação transversal e longitudinal, em toda a extensão das amostras, com áreas de reação inflamatória focal escassa, ou mesmo ausência de infiltrado. A substância cinzenta apresentou celularidade glial normal em morfologia e quantidade compatível com o controle saudável (figuras 17f, 18f e 19f).

Assim como nos tratados com Lico A, os grupos tratados com o *trans*-cariofileno, principalmente na dose 25mg/Kg, foi observado áreas de alterações degenerativas hialinas e/ou apoptose neuronal, bem como aspecto vacuolado periaxonal. No entanto, infiltrado inflamatório perivascular e subaracnoideu nos grupos tratados com essa substância foram encontrados principalmente no córtex encefálico.

A observação das amostras da substância branca dos grupos tratados com Lico A, e principalmente com *trans*-cariofileno, em maiores doses, revelou melhor preservação da mielina e menos intensidade inflamatória quando comparadas com as amostras obtidas do grupo com a EAE, não tratadas.





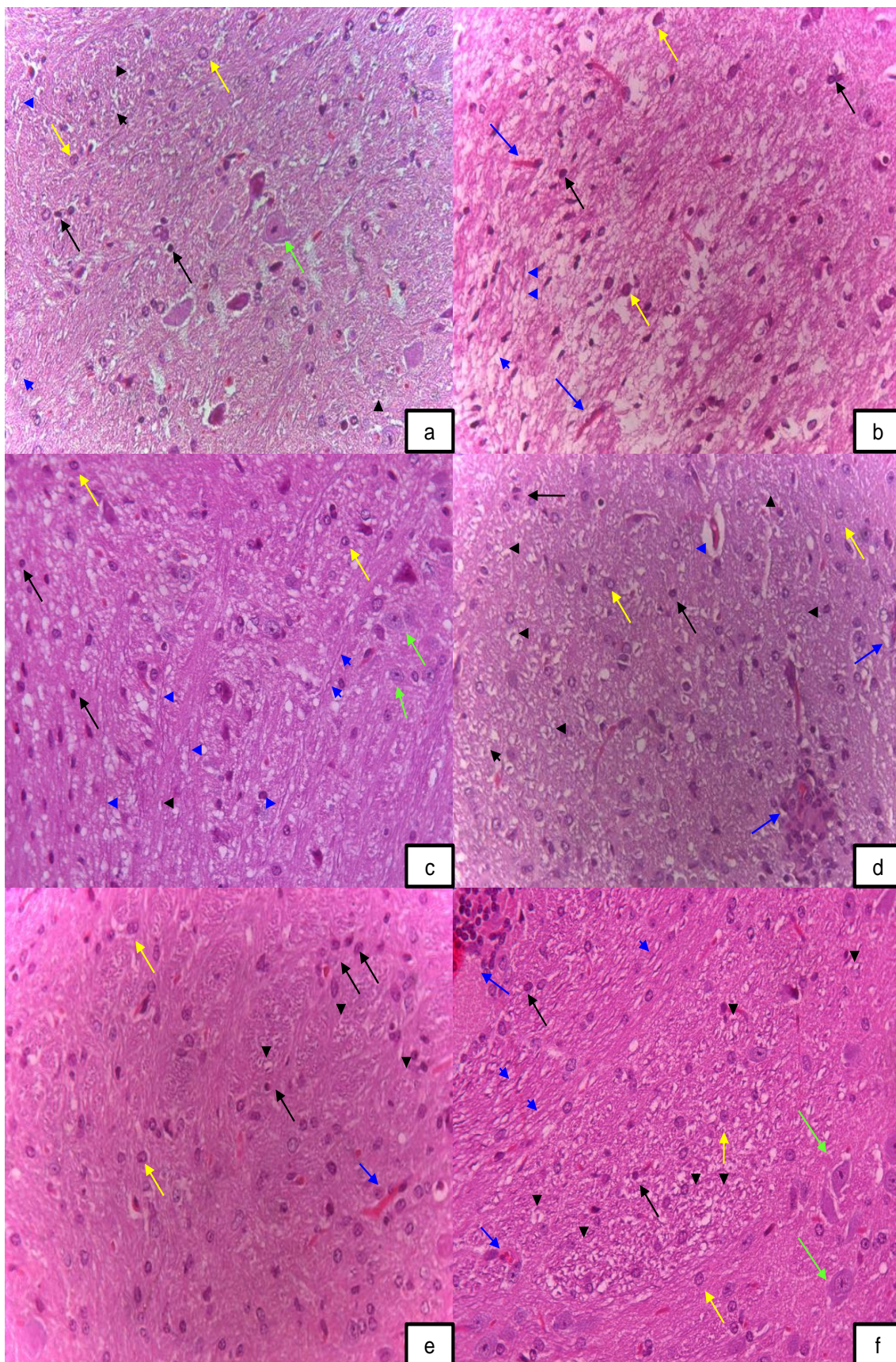
**Figura 17-** Cortes histológicos de medula espinal de camundongos C57BL/6. Coloração HE. Aumento original 400x

**(a)** Grupo controle, saudável. Substância branca com abundância de fibras mielínicas celularidade glial normal em morfologia e quantidade; Vasos sanguíneos livres de infiltrado inflamatório. **(b)** Grupo EAE, doente; Escassez de fibras mielínicas e celularidade glial aumentada em morfologia e quantidade. Vasos sanguíneos com infiltrado inflamatório. **(c)** Grupo EAE + L15, doente. Substância branca bastante mielinizada com presença de infiltrado inflamatório mononuclear subaracnoideo, aspecto vacuolado periaxonal; Substância cinzenta discreto aumento glial; **(d)** Grupo EAE + L30, doente. Substância branca- infiltrado inflamatório mononuclear com fibras mielínicas abundantes e aspecto vacuolado periaxonal **(e)** Grupo EAE + T25, doente. Substância branca com abundancia de fibras mielínicas e substância cinzenta discreto aumento da celularidade da glia **(f)** Grupo EAE + T50, doente. Substância branca com abundantes fibras mielínicas e celularidade compatível com a normalidade;

(→) células com morfologia sugestiva de oligodendrócito; (→) células com morfologia sugestiva de astrócito; (→) pericário; (→) vasos sanguíneos; (▶) fibras mielínica- corte longitudinal; (▶) fibras mielínicas- corte transversal;

**Figura 17- Cortes histológicos de medula espinhal de camundongos C57BL/6.** Coloração HE. Aumento original 400x.

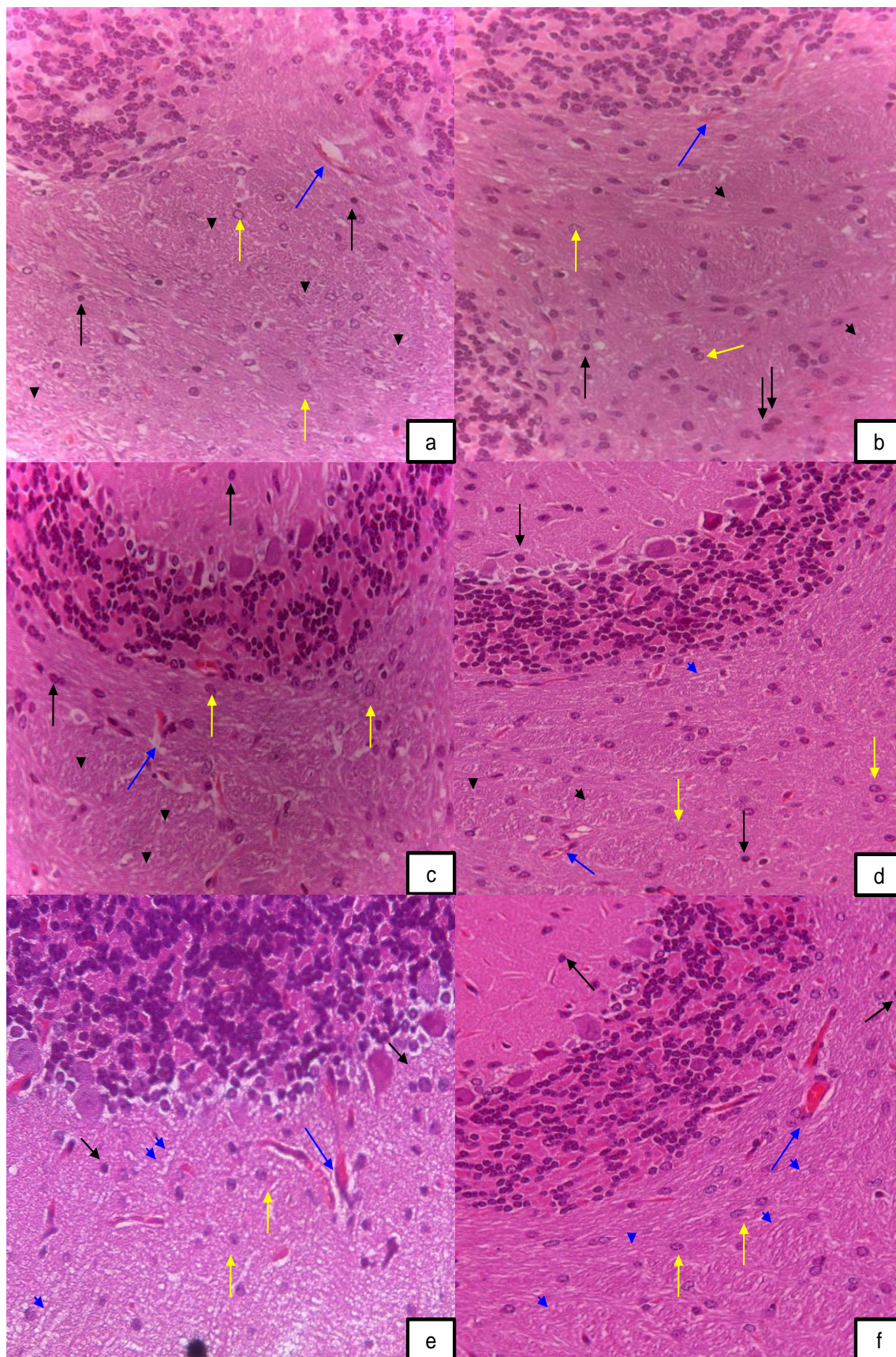




**Figura 18-** Cortes histológicas de cérebro de camundongos C57BL/6. Coloração HE. Aumento original 400X.

(a) Grupo controle, saudável- Substância branca e substância cinzenta, mostrando vasos sanguíneos livres de infiltrado inflamatório e com celularidade compatível com a normalidade; (b) Grupo EAE, doente. Substância branca e substância cinzenta, com celularidade aumentada e espaçamento de fibras mielínicas. (c) Grupo EAE + L15, doente. Substância branca, com dessaranjo fibrilar e menos número de fibras mielínicas; Substância cinzenta discreto aumento da celularidade glial. (d) Grupo EAE + L30, doente. Substância branca- infiltrado inflamatório mononuclear com fibras mielínicas abundantes. (e) Grupo EAE + T25, doente. Substância branca com pouca mielinização, desorganização do arranjo fibrilar e presença de focos inflamatórios perivasculares mononucleares. (f) Grupo EAE + T50, doente. Substância branca com abundantes fibras mielínicas, presença de poucos focos de infiltrado inflamatório perivascular e celularidade compatível com a normalidade; (→) células com morfologia sugestiva de oligodendrócito; (→) células com morfologia sugestiva de astrócito; (→) pericário; (→) vasos sanguíneos; (▶) fibras mielínicas - corte longitudinal; (▶) fibras mielínicas- corte transversal; **Figura 18- Cortes histológicos de cérebro de camundongos C57BL/6.** Coloração HE. Aumento original 400x.





**Figura 19-** Cortes histológicas de cerebelo de camundongos C57BL/6. Coloração HE. Aumento original 400X.

(a) Grupo controle, saudável- substância branca fibras mielínicas em padrão e quantidade compatíveis com a normalidade (b) Grupo EAE, doente. Substância branca e substância cinzenta, com celularidade aumentada e espaçamento de fibras mielínicas. (c) Grupo EAE + L15, doente. Substância branca com fibras mielínicas abundantes e substância cinzenta com discreto aumento da celularidade glial. (d) Grupo EAE + L30, Substância branca com fibras mielínicas abundantes e substância cinzenta com discreto aumento da celularidade glial. (e) Grupo EAE + T25, doente. Substância branca com mielinização reduzida, desorganização do arranjo fibrilar e menor celularidade da camada glanulosa. (f) Grupo EAE + T50, doente. Substância branca com abundantes fibras mielínicas; (→) células com morfologia sugestiva de oligodendrócito; (→) células com morfologia sugestiva de astrócito; (→) pericário; (→) vasos sanguíneos; (↗) fibras mielínicas- corte longitudinal; (↖) fibras mielínicas- corte transversal; **Figura 19- Cortes histológicos de cerebelo de camundongos C57BL/6.** Coloração HE. Aumento original 400x.

## 6 DISCUSSÃO

A EM é a patologia desmielinizante mais comum do SNC, que acomete principalmente mulheres jovens, caucasianas, de uma maneira extremamente invasiva. Sua etiologia e patogênese ainda não são completamente conhecidas, no entanto, nos últimos anos, avanços importantes ocorreram em relação à compreensão dos mecanismos responsáveis pelos aspectos patológicos cruciais da EM. Sobre a mesma, tem sido demonstrado que processos autoimunes direcionados aos componentes da bainha de mielina e oligodendrócitos apresentam papel chave na mediação do processo inflamatório da doença, sobretudo no seu desencadeamento (FLETCHER et. al., 2010; LASSMANN, 2011; WALKER et. al.; 2011).

A EAE é uma doença inflamatória do SNC, mediada por células T CD4<sup>+</sup>, e amplamente utilizada como modelo clínico experimental para o estudo da esclerose múltipla. Como mencionado na revisão de literatura, esse modelo não só reflete as características histopatológicas da EM, como é um modelo adequado na investigação do desenvolvimento de células T durante as reações imunológicas. Tanto que se tornou um dos modelos mais utilizados, durante os últimos 30 anos, na pesquisa de células T em imunologia e tem ajudado a entender os mecanismos inflamatórios da EM, assim como auxiliado no desenvolvimento e teste de novas drogas (HART et. al., 2011).

No 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 demielinizantes, porém o sistema nervoso periférico não é atingido, padrão este, semelhante ao encontrado na EM. A utilização da proteína MOG tem sido objetivo de vários estudos que apoiam a possibilidade de ela ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM (SILVA et. al., 2008a; CROXFORD et. al., 2010; MIX et. al., 2010b).

As células no SNC produzem citocinas e, em grande parte, quimiocinas que desempenham papel essencial no estabelecimento e manutenção de processos autoimunes, agindo de forma sinérgica e redundante sobre diversos tipos celulares (CORRÊA, et. al., 2010; PERON, et. al., 2010). Na EM as lesões



demielinizantes são provocadas, entre outros fatores, por linfócitos Th1 e Th17, apresentando elevados níveis de IFN- $\gamma$  e potente 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 (YANYING, et. al., 2007; SILVA et. al., 2008a; GONZÁLEZ-GARCÍA et. al., 2009). A expressão clínica inicial da lesão axonal em um modelo de EAE é representado por sinais bem definidos, tais como a perda de peso, paralisia da cauda e fraqueza dos membros posteriores (De PAULA , et. al., 2008).

Em nosso experimento, a EAE foi induzida em fêmeas de camundongos C57BL/6 e os grupos separados pelo tratamento em: tratados com a Lico A nas dosagens de 15 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia e tratados com o *trans*-cariofileno nas dosagens de 25mg/kg/dia e 50 mg/Kg/dia, todos por via oral.

Os sinais clínicos desenvolvidos pelos animais induzidos com a EAE durante os experimentos mostraram um curso ascendente semelhante ao descrito na literatura: Perda do tônus da cauda, paralisia parcial dos membros posteriores, paralisia severa dos membros posteriores, tetraplegia e animais moribundos (LEADBETTER, 1998; MOHAMED et. al., 2004; PERON, 2010).

Os animais não apresentaram, pelo menos até o 20° dia, nenhum óbito, como é descrito por alguns autores na indução da EAE (De PAULA et. al., 2008, ALVES et. al., 2012).

Em nosso trabalho, os animais do grupo EAE iniciaram os sintomas ao nono dia pós-indução, semelhante ao mostrado por outros trabalhos (RODRIGUES et. al., 2009, DUTRA et. al, 2012). Apresentando queda de tônus de cauda e uma evolução progressiva dos sintomas evoluindo em sua maioria para a paralisia severa dos membros posteriores (três animais) e até a tetraplegia e estado moribundo (dois animais) em torno do 17° dia. Destacando ainda, que todos os animais (n=5) apresentaram sintomas da EAE. Na fase final do curso clínico (18° e 19° dia) os animais apresentaram escore clínico médio em torno de 3,2 compatível com a paralisia severa dos membros posteriores e começaram a apresentar melhora clínica (20° dia), com escore clínico médio de 3,0, onde foram então sacrificados para os demais experimentos.

Pelo fato da EM não ter possibilidade de cura atualmente, vários trabalhos vêm testando novas alternativas terapêuticas para a EM, utilizando o modelo murino, a EAE, visto que, os tratamentos atuais além de dispendiosos, são pouco efetivos em muitos casos. Em estudo realizado por OLIVEIRA et. al. (2009), a sinvastatina, substância usada no tratamento de dislipidemia, foi testada em camundongos C57BL/6, induzidos previamente com MOG<sub>35-55</sub>, e nas doses de 1 mg/Kg/dia e 5 mg/Kg/dia e foi capaz de atenuar os sintomas clínicos da EAE.

Em relação aos tratamentos utilizados, no escore clínico, os grupos em que os animais que tiveram redução significativa dos sintomas foram, os tratados com o *trans*-cariofileno na dose de 50 mg/Kg/dia ( $p < 0,001$ ), desde o 14° dia até o final do experimento (20° dia), e os tratados com a Lico A na dose de 30 mg/kg/dia ( $p < 0,05$ ), desde o 15° dia, quando comparados aos animais com a EAE.

Já os camundongos tratados com a Lico A e o *trans*-cariofileno nas menores doses (15 mg/Kg e 25 mg/Kg, respectivamente), apesar de manter os escores clínicos sempre menores que os do grupo com a EAE, e também levarem a uma estabilização clínica observada entre o 17° e 20° dia, não apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo (EAE).

No trabalho de ALVES et. al. (2012), a EAE foi induzida em camundongos C57BL/6 e mostrou que o tratamento com a mitoxantrona e seu análogo estrutural, levou a redução significativa dos sintomas neurológicos, porém com a perda de peso semelhante entre os animais doentes e tratados.

Concomitantemente com o escore clínico, foi avaliada também em nossos experimentos, a perda de peso dos animais, como um segundo parâmetro clínico. As análises estatísticas mostraram que, como o esperado, a diferença das médias da perda de peso dos animais do grupo EAE em relação aos do grupo controle negativo foram estatisticamente significantes, e começaram a ser observada, à partir do 15° dia ( $p < 0,05$ ). A maior significância estatística foi observada a partir do 16° ( $p < 0,001$ ). Porém no 19° já observamos uma redução na diferença das médias de perda de peso entre os grupos ( $p < 0,01$ ). Fato esse, correlacionado com a melhora no escore clínico do grupo com a EAE, no mesmo dia.

Em relação aos grupos tratados, o único que apresentou diferença de peso quando comparado aos animais do grupo EAE, foram os tratados com *trans*-cariofileno na dose de 50 mg/Kg. Nestes, a diferença entre as médias das pesagens começaram a ser significantes antes mesmo do grupo controle, no 14° (p<0,05). Importante ressaltar também, que os pesos dos animais desse grupo ficaram muito próximos aos pertencentes ao grupo controle negativo.

Com isso, foi observado que o *trans*-cariofileno na dose de 50 mg/Kg proporcionou melhora clínica, tanto no quesito escore neurológico, quanto na manutenção do peso, de uma maneira dose-dependente, já que o mesmo não foi observado quando a mesma substância foi testada na dose de 25mg/Kg. Já a Lico A não apresentou diferença significativa em nenhum das doses testadas sobre o peso dos animais.

Embora um número de imunomoduladores e agentes imunossupressores já serem utilizados no tratamento de EM, novas e melhores estratégias terapêuticas são necessárias (DUTRA et. al., 2012). Com isso, produtos de origem natural, principalmente os de origem vegetal, como os metabólitos secundários, flavonóides, fitoestrogênios, entre outros, tem sido testados no modelo de EAE murino, demonstrando propriedades benéficas tanto na clínica como na inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios na EAE (HENDRIKS et. al., 2004; LINKER et. al. 2010).

Como no trabalho de De PAULA et. al. (2008), utilizando a isoflavona genisteína, principal composto bioativo da soja com atividade fitoestrogenas, em camundongos C57BL/6 indizados da EAE com MOG<sub>35-55</sub> e tratados com 200 mg/kg à partir do 14° dia pós-indução. Os resultados mediante tratamento com genisteína foram similares ao nosso, principalmente em comparação ao *trans*-cariofileno na maior dose, pois notaram efeitos benéficos significativos na diminuição da manifestação clínica da EAE, onde os animais tratados a substância apresentaram uma cinética de evolução clínica concordante demonstrada no presente estudo, apresentando preservação de peso e menor escore clínico. A melhora foi posteriormente justificada por uma diminuição na produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, assim como uma diminuição na permeabilidade de células para o SNC.



A perda de peso dos animais pertencentes a EAE, descrita em nosso trabalho, já vem sendo observada, associada a fase aguda da doença, como em trabalho recente realizado por SILVA (2010b), utilizando o mesmo modelo de EAE aqui descrito. Nesse trabalho, foi investigado o efeito imunomodulador do 17  $\beta$ -Estradiol. O tratamento com esse hormônio, que é um dos estrogênios usados na terapia de reposição hormonal, também reduziu a gravidade da EAE, levando a melhora dos sinais clínicos e sintomas observados.

Dados recentes apontam para um papel importante de vias antioxidantes para proteção de tecidos na EM (LEE et. al., 2012). A inflamação e o estresse oxidativo são responsáveis por promover o dano tecidual na EM. Assim, novas terapias aumentando a resistência celular aos radicais livres também podem ser úteis na terapêutica dessa patologia (LINKER et. al. 2010). Nos processos inflamatórios, os macrófagos potencializam a ativação de células T, além de produzirem espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (NO). Na EM as EROs também são responsáveis pela lesão direta da bainha de mielina, com isso, a diminuição da produção dessas substância pode levar a um prognóstico melhor (FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2009b; CORRÊA et. al., 2010; LEIPER e NANDI, 2011).

No trabalho de ALVES et. al. (2012), a mitoxantrona e seu análogo estrutural apresentaram a capacidade de reduzir a produção “*in vitro*” de NO e quando testada “*in vivo*”, os animais apresentaram melhora clínica com redução de sintomas neurológicos, embora sem preservação de peso dos animais tratados.

Nossos dados corroboram com o exposto acima, tendo em vista que maiores níveis de NO e  $H_2O_2$  encontrados, foram dos animais pertencentes ao grupo induzido com a EAE, sendo 38,082  $\mu\text{m}/\text{mL}$  e 0,235  $\mu\text{m}/\text{mL}$  respectivamente. A menor produção foi detectada no grupo controle negativo com níveis de NO de aproximadamente 6,88  $\mu\text{m}/\text{mL}$  e por volta de 0,11  $\mu\text{m}/\text{mL}$  de  $H_2O_2$ . Frente aos dados, a análise estatística mostrou que no grupo EAE foi significativamente maior ( $p < 0,01$ ) para a produção de  $H_2O_2$  e ( $p < 0,001$ ) para a produção de NO, frente a produção basal do grupo controle negativo.

Ao observarmos a figura 12, foi evidenciado que os tratamentos que apresentaram redução significativa de NO, em relação ao grupo EAE, foram os grupos tratados com o *trans*-cariofileno na dose de 50mg/kg ( $p < 0,001$ ) e com a Lico A na dose de 30 mg/Kg ( $p < 0,05$ ), mostrando um efeito dose-dependente.

O potencial imunomodulador na produção de NO, também foi avaliado em culturas de células do exudato peritonial murinos estimulados ou não com concanavalina A (Con A) e também em reação a MOG<sub>35-55</sub> (figura 12). Em relação à Con A, quatro grupos apresentaram maior produção: o controle negativo ( $p < 0,01$ ), os tratados com *trans*-cariofileno na dose de 50 mg/kg ( $p < 0,05$ ) e os tratados com Lico A nas duas doses testadas 15mg/Kg ( $p < 0,05$ ) e 30 mg/Kg ( $p < 0,01$ ), como o esperado. Já em relação a MOG, o grupo EAE foi o único em que a produção de NO frente ao estímulo, foi maior que o estimulado com a Con A.

Sabe-se que produção excessiva de NO tem sido relacionada com a patogênese da EAE. JOLIVALT et. al. (2003), utilizando camundongos SJL/J induzidos da EAE com a PBM, perceberam melhora clínica após o tratamento com uma dose subterapêutica de ciclosporina A e com NOX-100, um captador de óxido nítrico, sendo que essas substâncias em combinação apresentaram maiores efeitos, conduzindo a uma proteção quase total a doença, assim como diminuição na produção de NO e inflamação no SNC.

Os resultados aqui encontrados na avaliação clínica e produção de NO são semelhante ao encontrado por LJUBISAVLJEVIC et. al. (2011), que utilizaram aminoguanidina e N-acetil-L-cisteína no tratamento em ratos da linhagem Sprague Dawley (induzidos da EAE). Essas substâncias foram capazes promover melhora na clínica observada, fato esse, atribuído a diminuição dos níveis de NO em relação à produção encontrada nos animais controle positivo ( $p < 0,05$ ).

Ao analisarmos os resultados da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 13), observamos que, o único grupo que não apresentou redução significativa na produção de peróxido de hidrogênio frente ao grupo EAE foi o grupo tratado com 25 mg de *trans*-cariofileno (com produção aproximada de 0,18  $\mu\text{M/mL}$ ). Nos demais grupos a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dos grupos com a EAE e tratados foram significativamente menores.

Em produção de  $H_2O_2$  pelas células do exudato peritoneal estimuladas com a Con A e MOG<sub>35-55</sub>, foi observado que tanto a Lico A como o *trans*-cariofileno, em ambas as doses testadas foram capazes de inibir a produção desse radical livre mesmo após estímulo.

O trabalho de SCOTT E BOLTON (2000) demonstrou que a administração de L-arginina (0,95%) em ratos de Lewis induzido a EAE suprime o desenvolvimento dos sinais clínicos neurológicos observados, assim como a formação de lesões inflamatórias no SNC, em consequência da acentuada redução da produção de NO e  $H_2O_2$ . Em nosso estudo, o tratamento com o *trans*-cariofileno, na maior dosagem, demonstrou perfil semelhante na redução dos níveis de NO e  $H_2O_2$ .

Em outro trabalho, LINKER et. al. (2010) utilizando no tratamento da EAE formulação oral do fumarato de dimetila em camundongos C57BL/6, relataram a capacidade dessa substância em reduzir a produção de radicais livres como o NO e o  $H_2O_2$ , levando a melhora dos sintomas clínicos da doença. Segundo o autor o resultado encontrado está diretamente relacionado com a capacidade citoprotetora do fumarato e dimetila, que potencializa as respostas dos antioxidantes naturais no tecido. Dados mais recentes mostraram a capacidade dessa substância para reduzir a atividade da doença e progressão a partir de uma combinação inovadora de mecanismos imunomoduladores e neuroprotetores (LEE et. al., 2012). Os testes com essa substância foram tão promissores que em 2013, o FDA aprovou o medicamento Tecfidera<sup>®</sup> (fumarato de dimetila) como novo tratamento oral de primeira linha para pacientes com formas recorrentes de EM.

Sabe-se que os animais induzidos da EAE apresentam elevados níveis de INF- $\gamma$  (FLETCHER et. al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013). Essa citocina, quando muito elevada, leva a ativação dos macrófagos no SNC. Esses, passam a produzir grandes quantidades de  $H_2O_2$ , NO e TNF- $\alpha$ . A ocorrência de níveis elevados de TNF- $\alpha$  está associada com as mudanças na permeabilidade da BHE, assim como com a presença de mediadores inflamatórios e células infiltradas nos tecidos do SNC, tanto em pacientes com EM como com EAE (STEINMAN et. al., 2005; FIGUEROA et. al., 2008). Além disso, tanto o TNF- $\alpha$ , quanto o INF- $\gamma$  estão associados com a resposta Th1 e

induzem a ativação de uma variedade de tipos de células e expressão de moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, no SNC, o que levam a neuroinflamação (FURLAN, et. al., 2004; YANYING, 2007; CORRÊA et. al., 2010; DUTRA et. al., 2012).

Neste trabalho as citocinas IL-17, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  também foram dosadas no sobrenadante de culturas de esplenócitos no pico da EAE após o tratamento com a Lico A e com o *trans*-cariofileno. Nos animais com EAE os níveis dessas citocinas foram significativamente maiores que nos animais pertencentes controle negativo ( $p < 0,001$  em todos os casos).

O grupo tratado com Lico A na dose de 15mg/Kg não apresentou redução significativa na produção de nenhuma dessas citocinas quando comparado com a produção encontrada no grupo doente. A produção de INF- $\gamma$  no grupo com a EAE foi de aproximadamente 293 pg/mL e de TNF- $\alpha$  826 pg/mL.

Em relação ao INF- $\gamma$  (figura 14) os grupos que tiveram valores significativamente menores foram os tratados com a Lico A na dosagem de 30mg/Kg/dia, onde os níveis encontrados foram de aproximadamente 196pg/mL ( $p < 0,01$ ), com o *trans*-cariofileno na dose de 25mg/kg e 50mg/Kg (141pg/mL e 81pg/mL, respectivamente, com  $p < 0,001$  em ambos os casos).

O mesmo resultado foi encontrado em relação a produção de TNF- $\alpha$  (figura 15), tendo em vista que a produção no grupo tratado com Lico A na maior dose foi de aproximadamente 558pg/mL, e nos tratados com o *trans*-cariofileno na dose de 25mg/Kg a produção foi de 310pg/mL e com 50mg/Kg a produção foi de 119pg/mL ( $p < 0,001$  em todos os casos).

Logo, nossos corroboram com o trabalho de CHEN et. al., (2010), onde foram examinados os efeitos da cumarina Ostol, mediante ao tratamento com 30mg/Kg, no 13º dia pós indução, no desenvolvimento da EAE no mesmo modelo aqui proposto. A cumarina em questão também foi capaz de reduzir os sintomas clínicos, resultado atribuído a redução da produção das citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . O mesmo ocorreu no presente trabalho, sobretudo de uma maneira dose-dependente, tendo em vista que tanto em relação aos parâmetros clínicos analisados, quanto em relação a dosagem de citocinas a maior efetividade das substâncias testadas foram nas maiores doses.

A patogênese da EM e da EAE é um processo complexo, que envolve uma forte resposta específica de células Th1 e TH17, macrófagos, células dendríticas, astrócitos e microglia, bem como uma gama de mediadores produzidos por estas células contra antígenos da mielina. Os mecanismos que levam a desmielinização ocorrem por meio, principalmente, de elevada produção de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17, ou ativação de outras células como, por exemplo, os macrófagos que atuam tanto produzindo NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como mais TNF- $\alpha$  e várias enzimas com efeito proteolítico (BETTELLI et. al., 2006; VELDHÖEN et. al., 2006; FLETCHER et. al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013).

A IL-17 tem sido diretamente implicada no desenvolvimento e na manutenção, tanto da EM como da EAE. Sabe-se que a transferência de células Th17 induz EAE em uma forma mais grave, em comparação com a transferência de células Th1 (THÖNE et. al., 2012). Recentemente, AXTELL et. al., (2010) correlacionaram a maior atividade de doença, em pacientes classificados como não respondedores ao tratamento com IFN- $\beta$ , com níveis altos de IL-17. Esses autores sugerem que em pacientes com EM ocorra uma maior ativação da via Th17 resultando em uma forma mais grave da doença.

No presente trabalho, observamos que todos os grupos tratados tanto com a Lico A ( $p < 0,05$  na dose de 15mg/kg e  $p < 0,001$  na dose de 30 mg/kg), como com o *trans*-cariofileno ( $p < 0,001$  em ambas as doses testadas) apresentaram redução significativa mediante a administração dos tratamentos, de uma maneira dose-dependente na produção de IL-17 (figura16). Contudo, apesar de se ter relatos na literatura de que a Lico A inibe o STAT 3, fator de transcrição para IL-17 (FUNAKOSHI-TAGO et. al., 2008a), o *trans*-cariofileno parece ser mais efetivo na inibição dessa citocina, talvez por vias adicionais, como na inibição da IL-23, citocina primordial na produção de IL-17. Porém estudos no sentido de esclarecer esse mecanismo se fazem necessários.

Dados similares foram os encontrados por DUTRA et. al. (2012), utilizando o Eufol, um triterpeno tetracíclico com ação anti-inflamatória no tratamento de camundongos C57BL/6 induzidos a EAE com a MOG<sub>35-55</sub> nas doses de 1-10 mg/kg, via oral. Os autores demonstraram que o Eufol além de atenuar significativamente sinais neurológicos de EAE, diminuiu sua manifestação clínica, sendo capaz de modular a expressão da sintase

induzível de óxido nítrico (*iNOS*), assim como, diminuir a ativação de células Th17 e sua migração para o SNC. Retardando assim o início da doença e induzindo uma patologia menos grave no SNC.

Na EM, as lesões estão associados com a expressão de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1 $\beta$  e IL-6) e de outros mediadores inflamatórios, tais como o óxido nítrico-sintase induzível (*iNOS*) e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que por sua vez, desempenham um papel crítico também na infiltração de células imunitárias durante a progressão da EAE. O dano causado por esses mediadores reflete na clínica observada (DUTRA et. al., 2012). Contudo, a severidade da doença está estritamente correlacionada com a ruptura da integridade da BHE e conseqüentemente com o aumento do infiltrado mononuclear no SNC e edema associado (YANYING et. al., 2007; BOWIE et. al., 2012). Com a finalidade de investigar o desenvolvimento da reação inflamatória e o processo de desmielinização do SNC foram feitas colorações histológicas com HE em amostras de encéfalo e medula espinhal.

Observando as lâminas, foi constatado que os animais com a EAE que não receberam nenhum tipo de tratamento apresentaram grande infiltrado inflamatório mononuclear e congestão vascular tanto na meninge na superfície cortical ou nos sulcos corticais como no parênquima cerebral. Foi observado também redução drástica do número fibras mielínicas, assim como evidente afrouxamento das mesmas, além da hiperplasia da oligodendroglia. Pode-se observar também na coloração de HE a ausência de infiltrado inflamatório nos animais controle negativo.

Estes dados confirmam os obtidos por ADZEMOVIC et. al. (2013), os quais mostraram em camundongos C57BL/6 imunizados com MOG<sub>35-55</sub> que nos sítios de infiltrados celulares inflamatórios ocorrem desmielinização extensiva e perda axonal, sendo que o tratamento com Imatinib, um medicamento usado para tratar certos tipos de câncer, foi capaz de prevenir essa perda.

Em relação aos tratamentos administrados no presente trabalho, os achados histológicos mais acentuados foram observados nos grupos tratados com as menores doses da Lico A e do *trans*-cariofileno. Nestes grupos, foram evidenciadas áreas com menor densidade de fibras mielínicas, aumento da

celularidade glial e desorganização fibrilar, além de menor celularidade em ambos os grupos e na camada granulosa do cerebelo do grupo tratado com o *trans*-cariofileno na dosagem de 25 mg/Kg. Esses danos histopatológicos visualizados podem estar correlacionados com a maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas principalmente de NO por esses grupos, e no caso do grupo tratado com a Lico A na dose de 15mg/Kg, também pelos elevados níveis de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ .

O trabalho realizado por FARIAS (2004) corrobora essa hipótese, pois foi investigada a participação do NO (Via *iNOS*) por ELISA e por análise histopatológica, na evolução da EAE induzida com MOG<sub>35-55</sub>, tanto em animais KO para *iNOS*, como nos correspondentes não modificados geneticamente (C57BL/6). Os dados mostram que houve redução significativa da gravidade da doença, avaliada tanto na clínica, como histopatologicamente nos animais KO para *iNOS*. Associando assim os maiores danos observados na histologia com elevados níveis de NO.

Cabe ressaltar que os achados histológicos sugestivos de alterações degenerativas neuronais ou de apoptose, assim como o aspecto vacuolado periaxonal, observados na substância branca dessas amostras, em maior número e quantidade nas menores doses das duas substâncias testadas, mas também presente nas amostras do grupo tratado com a Lico A na dose de 30 mg/Kg, essas, podem representar o início do processo inflamatório e/ou estar associados com a clínica tardia observada sobretudo no grupo tratado com a Lico A na maior dose.

Um fato instigante ocorreu nos animais tratados com o *trans*-cariofileno, na dosagem de 50mg/Kg/dia, a presença de infiltrado inflamatório mononuclear foi muito menos intenso em todas as amostras analisadas (figuras 17f, 18f e 19f). Já grupo tratado com a Lico A na dosagem de 30mg/Kg/dia esta redução não foi tão drástica, mas ainda sim esteve presente (figura 17d, 18d e 19d). Fica evidente então, que o tratamento com a Lico A e principalmente com o *trans*-cariofileno, nas maiores doses, reduz o infiltrado inflamatório mononuclear no encéfalo e na medula de camundongos C57BL/6 com a EAE. A redução do infiltrado inflamatório correlaciona-se com a menor produção de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-17, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (YANYING et. al., 2007; CORRÊA et. al., 2010; DUTRA et. al., 2012)). Portanto, ficou claro que a redução dos níveis de

radicais de oxigênio, citocinas e características de normalidade do infiltrado mononuclear nos animais tratados correlacionam-se com o menor escore clínico dos animais e preservação do peso, principalmente no grupo tratado com o *trans*-cariofileno na dosagem de 50mg/Kg/dia.

Achados semelhantes ao encontrado por CORRÊA et. al. (2010), utilizando Talidomida (30 mg/Kg) e Pentoxifilina (100 mg/Kg) como tratamento em ratos de Lewis (induzidos de EAE) via intraperitoneal (n=10). Onde a apesar do tratamento com a Pentoxifilina ter reduzido a manifestação clínica da EAE, a produção de IFN- $\gamma$ , NO e TNF- $\alpha$ , e os focos inflamatórios mononucleares no SNC, o tratamento com a Talidomida se mostrou mais eficaz, revelando ser uma estratégia promissora para a terapêutica nas doenças inflamatórias desmielinizantes do SNC como a EM.

Analisados em conjunto percebemos que ocorreu uma correlação entre achados histopatológicos com o escore clínico e a dosagem de radicais livres e citocinas. Tendo em vista que nos animais que apresentaram escores clínicos elevados foi observado também, altas dosagens de citocinas e radicais livres, além de múltiplas áreas de infiltrado inflamatório bem desenvolvido no SNC e áreas de desmielinização, sobretudo nos animais pertencentes ao grupo com a EAE. Em nosso experimento, o fato de que os animais tratados com a Lico A na dose de 30mg/kg e *trans*-cariofileno na dose de 50mg/Kg terem apresentados escores clínicos baixos e mais tardiamente que os outros grupos, além de baixas dosagens de citocinas e radicais oxigenados, estão associados à capacidade dessas substâncias de inibirem e/ou retardarem o infiltrado inflamatório e a desmielinização de uma maneira, provavelmente, dose-dependente.

Portanto, os resultados do presente experimento sugerem forte evidência do efeito terapêutico da Lico A e, principalmente, do *trans*-cariofileno sobre a evolução clínica da EAE. A correlação entre os níveis de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-17, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , poucas áreas de infiltrado inflamatório mononuclear, processo de desmielinização menos intensos e evolução clínica pouco expressiva da EAE nos animais que receberam o tratamento com essas substâncias nas maiores doses, suportam essa hipótese.



Apesar da complexidade da EM e das dificuldades do seu tratamento, as substâncias aqui testadas mostram-se promissoras como possíveis estratégias terapêuticas nas doenças inflamatórias desmielinizantes do SNC.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu chegar a considerações sobre um efeito modulador da Licochalcona A e do *trans*-cariofileno sobre o curso clínico da Encefalomielite Autoimune Experimental.

- Camundongos C57BL/6 com a EAE apresentaram a partir do 9º dia após a indução da doença severos sintomas clínicos associados a elevados níveis séricos de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, vários focos de infiltrado inflamatório mononuclear no cérebro e na medula espinhal e presença de áreas de desmielinização;
- Camundongos C57BL/6 tratados com a Licochalcona A 15mg/Kg apresentaram sintomas clínicos menores, menor perda de peso (até o 17º dia), menor produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e menor presença de infiltrado inflamatório e maior preservação das fibras mielínicas no SNC que o grupo doente (EAE), porém não foram significativos.
- Animais tratados com a Licochalcona A 30mg/Kg apesar de apresentaram menores sintomas clínicos e menor perda de peso que os animais do grupo EAE, não foram significativos. Contudo neste grupo houve menor produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e menor presença de infiltrado inflamatório e maior preservação das fibras mielínicas no SNC que o grupo doente (EAE), com diferença estatística em comparação com o grupo com a EAE.
- Camundongos C57BL/6 tratados com o *trans*-cariofileno 25mg/Kg apresentaram sintomas clínicos menores, menor perda de peso, menor produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menor presença de infiltrado inflamatório e maior preservação, porém a diferença não foi significativa em comparação com os mesmos dados no grupo doente (EAE). No entanto os níveis INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 das fibras mielínicas no SNC que o grupo doente (EAE), porém não foram significativos.
- Animais tratados com o *trans*-cariofileno 50mg/Kg praticamente não apresentaram escore clínico neurológicos da EAE, ficando restritos a dois

animais, também não apresentaram perda de peso no decorrer do experimento. Estes tiveram menores níveis de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, praticamente não apresentaram infiltrados inflamatórios mononucleares no SNC ausência de áreas de desmielinização coradas pó HE no cérebro, medula espinhal e cerebelo.

Os dados deste estudo revelam que a Licochalcona A e, notadamente, o *trans*-cariofileno atuam sobre o mecanismo de desenvolvimento da EAE, de uma maneira dose-dependente, modulando a resposta imunológica tanto de células peritoneais quanto de esplenócitos através da redução dos níveis de citocinas Th1 e Th17, bem como de radicais de oxigênio. Esta redução nos parâmetros imunológicos se correlacionaram com melhores aspectos histológicos no SNC que culminaram com eficácia sobre os parâmetros clínicos apresentados na EAE.

A utilização destas substâncias pode ser uma importante estratégia terapêutica a ser empregada no tratamento de doenças inflamatórias e desmielinizantes como a EAE, a qual é amplamente utilizada como modelo de Esclerose Múltipla.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP B. J. **Histologia Essencial**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2012. 457 p.

ABEM – Associação Brasileira de Esclerose Múltipla. Disponível em: <<http://www.abem.org.br/>>. Accessed em: 28/06/2011.

ADZEMOVIC, M. Z.; ZEITELHOFER, M.; ERIKSSON, U.; OLSSON, T.; NILSSON I.; Imatinib Ameliorates Neuroinflammation in a Rat Model of Multiple Sclerosis by Enhancing Blood-Brain Barrier Integrity and by Modulating the Peripheral Immune Response. **Plos ONE**. v.2, p.565-86. 2013.

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 117-126, mar 2008.

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.

AKKUS, Y.; AKDEMIR N. Improving the quality of life for multiple sclerosis patients using the nurse-based home visiting model. **Scandinavian Journal Of Caring Sciences**, v.26, p.295-303, 2011.

ASL M. N., HOSSEINZADEH H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. **Phytotherapy Research**, v. 22, p.709-24, 2008.

AXTELL, R. C.; JONG, B. A.; BONIFACE, K., VAN DER VOORT, L. F. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-B in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. **Nature Medicine**, v.16, 406-13, 2010.

BARFOD, L.; KEMP, K.; HANSEN, M.; KHARAZMI, A. Chalcones from Chinese liquorice inhibit proliferation of T cells and production of cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 545-55, 2002.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-88, 2009.

BERTO, P.; AMATO, M.P.; BELLANTONIO, P.; BORTOLON, F.; CAVALLA, P.; FLORIO, C.; LUGARESI, A.; MONTANARI, E.; ROTTOLI, M.; SIMONE, I. L.; ZAFFARONI, M. The direct cost of patients with multiple sclerosis: a survey from Italian MS centres. **Neurological Sciences**, v.32, p.1035–41, 2011.

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.

BISAGA, G. N.; ODINAK M. M.; BOIKO, A. N.; MELNIK, Yu. 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.

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.

BOL, Y. ; SMOLDERS, J.;DUITS A.; LANGE, I. M. J.; ROMBERG-CAMPS, M.; HUPPERTS ,R. Fatigue and heat sensitivity in patients with multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica** , v.10, p.1-6. mar 2012.

BOWIE, L. E.; ROSCOE, W. A.; LUI, E. M; SMITH, R.; KARLIK, S. J.; Effects of an aqueous extract of North American ginseng on MOG(35-55)-induced EAE in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.90, p.933-9. 2012.

BRANDÃO, C. M. R.; GUERRA A. A.;, CHERCHIGLIA, M.L.; ANDRADE, E. G.; ALMEIDA, A. M. ; SILVA, G. D.; QUEIROZ, O. V.;, FALEIROS, D. R. Gastos do Ministério da Saúde do Brasil com Medicamentos de Alto Custo: Uma Análise Centrada no Paciente. **Value In Health**, v.14, p.71-77, 2011.

BRUCK, W.. The pathology of Multiple Sclerosis is the of Focal Inflammatory demyelination with axonal damage.**Jornal of Neurology**, v.252, p.3-9, 2005.

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.208-13, 2001.

CARVALHO, MCA. **Encefalomielite Autoimune Experimental. Importância da expressão de fibronectina no desenvolvimento das lesões**. 1999. 132 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal Fluminense.

CARVALHO, J.C.T. Constituintes de plantas com atividade antiinflamatória. In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmedd**. v.1, p. 480, 2004a.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPLAN, M.A.C.; GILBERT, G. Topical antiinflammatory

and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 946-950, 2005b.

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.

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.265–74, 2011.

CHIBA, K. e ADACHI, K. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 as a Useful Target for Treatment of Multiple Sclerosis. **Pharmaceuticals**, v. 5, p. 514-28; 2012.

CHIARADIA, L. D.; DOS SANTOS, R.; VITOR, C. E.; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis and Pharmacological Activity of Chalcones Derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 Cells Stimulated by LPS: Quantitative Structure-activity Relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, P.658-67, 2008.

CHICARO, C. F. Análise da expressão da proteína nf-kappaB antes e depois do tratamento com dexametasona e os óleos de copaíba e andiroba em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal. 125f. Dissertação (Mestrado em odontologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CHO, J.Y.; CHANG, H.J.; LEE, S.K.; KIM, H.J.; HWANG, J.K.; CHUN, H.S..Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of  $\beta$ -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Sciences**, v.80, n.10, p.932-39, 2007.

COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **Lancet**, v.359, p.1221-31, 2002.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista. Virtual Química**, v.1, .p. 241-56 , 2009.

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.

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. 1237-41. 2010.

Da SILVA, A. G. ; FREITAS P., P.; LEITÃO, R. N.; GOMES, T. R.; SCHERER, R.; MARTINS, M. L. L.; CAVALCANTI, Á. S. S.; CAVALCANTI, L. C. Application of the essential oil from copaiba (*Copaifera langsdorffii* desf.) for acne vulgaris: A double-blind, placebo controlled clinical trial. **Alternative Medicine Review**. v. 17, p.69-75, 2012.

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. 103-11, 2010.

De PAULA, M. L.; RODRIGUES, D. H.; TEIXEIRA, H. C.; BARSANTE, M.M. ; SOUZA, M. A.; FERREIRA, A. Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v.8, p.1291-1297, 2008.

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, n.1, p.21-9, 2010.

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.

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.

ELLIOTT, C.;LINDNER, M.; ARTHUR, A.;BRENNAN, K.;JARIUS, S.; HUSSEY, J.;CHAN, A.;STOET, A.; OLSSON, T.;WILLISON, H.;BARNETT, S. C.; et.al. Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis.**Brain**, v.135, p.1819-33, 2012.

FARIAS, A. S. **Evolução clínica da encefalomielite experimental autoimune em camundongos geneticamente modificados (Knockout) para a óxido nítrico sintaxe induzida**. 2004. 91f. Dissertação (mestrado em clinica médica)-Faculdade de Ciências médicas da Universidade Estadual de Campinas.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/022699.txt>. Acesso: 29/06/2012.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B..Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v.569, p.228–36, 2007.

FIGUEROA-VEJA, N. ; MAJANO, P.; LARRAÑAGA , E.; BRAVO, J. M.; RODRÍGUEZ-RAMOS, R. ; GONZÁLEZ-AMARO ; MARAZUELA, M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in autoimmune thyroid disorders (AITD). **Endocrinología y Nutrición**, v. 55, p.340–45, 2008.

FINKELSZTEJN, A.; CRISTOVAM, R. A.; MORAES, G. S.; MELLO, M. G. S.; SILVA, A. V.; COLA, M. S.; MENEGAT, C. M.; et. al. Clinical Features of Multiple Sclerosis in the South of Brazil. **Arquivo de Neuro-Psiquiatria**, v.67, p.1071-75, 2009.

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.

Folha de São Paulo- Vitamina E e a Esclerose Múltipla. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/1096497-terapia-polemica-usa-vitamina-d-em-doses-altas-contras-esclerose-multipla.shtml>> Acesso: 03/07/2012

FRISULLO, G; NOCITI, V; IORIO R; et al. IL-17 and IFN- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. **Cytokine**, v. 44, n.1, p.22-5, 2008.

FURLAN, R.; VILLA, P.; SENALDI, G.; MARTINO, G. TNF $\alpha$  in diseases of the CNS. **Methods in Molecular Medicine**. v.98, p.171-90, 2004.

FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. Licochalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jak2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p.1681–1693, 2008a.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; TANABE, S.; TAGO, K.; ITOH, H.; MASHINO, T.;SONODA, Y.; KASAHARA,T. Licochalcone A Potently Inhibits Tumor Necrosis Factor-kB Induced Nuclear Factor-KB Activation through the Direct Inhibition of kB Kinase Complex Activation. **Molecular Pharmacology**, v.76, n.4, p.745-53, 2009b.

FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. The structure of Licochalcone A by  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF-kB activation. **International Immunopharmacology**, v.10, p. 562–571, 2010c.



FURUSAWA, J.I.; FUNAKOSHI-TAGO, M.; TAGO, K.; MASHINO, T.; INOUE, H.; SONODA, Y.; KASAHARA, T. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation at serine 276. **Cell Signal**, v.21 ,p.778–85, 2009.

GARBER, K. Anti-IL-17 mAbs herald new options in psoriasis. **Nature Biotechnology**, v.30, p. 475– 77, 2012.

GONZÁLEZ-GARCÍA, C.; MARTÍN, S.; BALLESTER, A.; BALLESTER, S. The Th17 lineage: Answers to some immunological questions. **Inmunología** , v. 28, p.32-45, 2009.

GRIGORIADIS, N.; HADJIGEORGIOU, G.H. Virus-mediated autoimmunity in multiple sclerosis. **Journal of Autoimmune Diseases**, v.3, p.1, 2006.

GUPTA, V.K.; FATIMA, A.; FARIDI, U.; NEGI, A.S.; SHANKER, K.; KUMAR, J.K.; et al. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, n. 11, p.377-80, 2008.

HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C. T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v.11, n.6, p.1123-32, 2005.

HART, B. A.; GRAN, B.; WEISSERT, R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v.17, p.119-25, 2011.

HENDRIKS, J. J. A. J.; ALBLAS, S. M. A.; VAN DER POL, E. A. F.; VAN TOL, C. D.; DIJKSTRA, H. E. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 1667–72, 2004.

HUYNH, W; CORDATO, D.J.; KEHDI, E; MASTERS, L.T.; DEDOUSIS, C. Post-vaccination encephalomyelitis: literature review and illustrative case. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.15, p.1315-22, 2008a.

HUYNH, J. L ; CASACCIA, P. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis implications for pathogenesis and treatment. **Lancet Neurology**, v.12(2), p.195-206, 2013b.

JOLIVALT, C. G.; HOWARD, R. B.; CHEN, L. S.; MIZISIN, A. P.; LAI, C.. A novel nitric oxide scavenger in combination with cyclosporine A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis progression in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 138, n. 1, p.56–64, 2003.

KAKALACHEVA, K.; LÜNEMANN, J. D. Environmental triggers of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v.585, p.3724–29, 2011.

KEBIR, H.; KREYMBORG, K.; IFERGAN, I.; DODELET, A; et al. Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, v.13, n.10, p.1173-75, 2007.

KERCHENSTEIN, M.;BAREYRE, F. M. ; BUDDEBEEBERG, B. S. ; MARKLER, D.;STADELMANN, C;BRUCK, W.; MISGELD, T. Remodeling of Axonal Connections to recovery in an Animal Model of Multiple Sclerosis.**The journal of Experimental Medicine**, v.200, n.8, p.1027-38, 2004.

KOLBE, L.; IMMAYER, J.; BATZER, J.; WENSORRA, U.; DIECK, K.T.; MUNDT, C.; WOLBER, R.; STAB, F.; SCHONROCK, U.; CEILLEY, R.I.; WENCK, H. Anti-inflammatory efficacy of Licochalcone A: correlation of clinical potency and in vitro effects. **Archives of Dermatological Research**, v.298, p.23–30, 2006.

LANA-PEIXOTO, M. A.; CALLEGARO, D.; MOREIRA, M. A.; CAMPOS, G. B.; MARCHIORI, P. E.; GABBAI, A. A.; et. al. Consenso expandido do bctrims para o tratamento da esclerose múltipla. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.60, p.881-886, 2002a.

LANA-PEIXOTO, M. A. Devic's neuromyelitis optica: a critical review. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.66, p.120-38, 2008b.

LANA-PEIXOTO, M. A., FROTA, E. R. C., CAMPOS, G. B.,MONTEIRO, L. P. The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brazil . **Arquivo de Neuro-Psiquiatria**, v.70, n.2, p.102-7, 2012c.

LASSMANN H.; Pathophysiology of inflammation and tissue injury in multiple sclerosis:What are the targets for therapy. **Journal of the Neurological Sciences**, v.306, p.167–9, 2011.

LEADBETTER, E. A.; BOURQUE, C. R.; DEVAUX, B. OLSON, C. D.; SUNSHINE, G. H.; HIRANI, S.; WALLNER, B. P.; SMILEK, D. E.; HAPP, M. P. Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide. **The Journal of Immunology**, v.161, p.504 -12, 1998.

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.11783-803, 2012.

LEITE, S. R. C. et. al. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com esclerose múltipla atendidos em m hospital de referência no estado do Maranhão, Brasil. **Revista do Hospital Universitário/UFMA**, v.10, n.1, p. 28-33, 2009.

LEIPER, J; NANDI, M. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.10, p.277-91. Apr 2011.

LINKER, R. A; LEE, D. H.; RYAN, S.; VAN DAM, A. M.; CONRAD, R.; BISTA, P.; ZENG, W.; HRONOWSKY, X.; BUKO, A.; CHOLLATE, S. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Brain**. v.34, p.678-92, 2010.

LJUBISAVLJEVIC S, STOJANOVIC I, PAVLOVIC D, SOKOLOVIC D, STEVANOVIC I. Aminoguanidine and N-Acetyl-Cysteine suppress oxidative and nitrosative stress in EAE rat brains. **Redox Report**, ; 16: 166-172. 2011

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.907-11, 1996.

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

LUDWIN, S. K. The pathogenesis of multiple sclerosis :relating human pathology to experimental studies. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.4, p.305-18, 2006.

LUNA, L.G. **Manual of histologic attaining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3 th ed. New York: McGraw- Hill Book Company, 258p. 1968.

MARRIE R. A.; YU, B. N.; LEUNG, S.; ELLIOTT, L.; CAETANO, P.; WARREN, S. Prevalence and incidence of ischemic heart disease in multiple sclerosis: A population-based validation study. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**. V.77, p. 24-35, 2013.

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.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G.F.; VITOR, C.E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T.L.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v.151, p. 618–27, 2007.

MIRANDOLA, S. R., HALLAL, D. E., FARIAS, A. S., et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. **International Immunopharmacology**, v.9, n.8, p.824-30, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE- Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para Esclerose Múltipla. Disponível em : [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=35115](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=35115) . Acesso: 30/01/2012.

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, p.7–14, 2008a.

MIX, E. MEYER-RIENECKER H, HARTUNG HP, ZETTL UK. Animal models of multiple sclerosis - Potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v.92, p.386-404, 2010b.

MOHAMED, A.; TARHUNI, H.; DUFAN, T.; BENGHUZZI, H.; TUCCI, M. The use of digital technology to assess the severity of the experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) spinal cord lesion. **Biomedical Sciences Instrumentation**, v.40, p.419-26, 2004.

MOORE, K.W., 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 bctrim para o tratamento da esclerose múltipla . As evidências para o uso de glicocorticóides e Imunomoduladores. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.60, p.875-80, 2002.

MORRIS, K.; YIANNIKAS, C. Treatment Update in Multiple Sclerosis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v.12, p.246–54, 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.

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.311–35, 2012.

NUALKAEW, S.; RATTANAMANEE, K.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; NAHRSTEDT, A. Anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of the leaves of *Mimosa pudica* Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 278-281, 2009.

OJEDA, E. Prevalence and clinical features of multiple sclerosis in Latin America. **Clinical neurology and neurosurgery**. v:115, p.38-1, 2013.

OLIVEIRA, D.M. **Efeito da Sinvastatina na Evolução Clínica e na resposta Imune Celular Th17 na Encefalite Auto Imune Experimental**. Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo, 2009.

OSBORN, L.; HESSION, C.; TIZARD, R.; VASSALLO, C., LUHOWSKYJ, S., CHI-ROSSO, G. et. al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. **Cell. Kidney International**, v.59, p.1203-11, 1989.

PENDER, M. Epstein–Barr vírus in the multiple sclerosis brain—An evasive culprit. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v.1, p.61–3, 2012.

PERON, JPS.; YANG, K.; CHEN, ML.; BRANDAO, WN.; BASSO, AS.; Commodaro, AG.; Weiner, HL.; Rizzo, LV. 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.10-7, Oct 2010.

PETERMANN, F.; KORN, T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. **FEBS Letters**, v. 585, p.3747-57, Abril 2011.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophage in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v.46, p. 211-26, 1981.

PROVENZA, F. D.; VILLALBA, J. J.. The role of natural plant products in modulating the immune system: An adaptable approach for combating disease in grazing animals. **Small Ruminant Research**, v.89, p.131-139, 2010.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C. *Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. **Química Nova**, v.30, n.6, p.1446-55, 2007.

RIBEIRO, S. B. F.; MAIA, D. F., RIBEIRO, J. B., CARDOSO, FABRÍZIO, A. G.; SILVA, C. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo de Neuro-Psiquiatria**, v.69, p.184-87, 2011.

RODRIGUES, D. H.; SACHS, D.; TEIXEIRA, A. L. Mechanical hypernociception in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 67, n.1, p.134-39, 2009.

RODRIGUES, I. M .C. et al. Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v.28, p.1-12, 2010.

SANTOS, A. C.; BARSANTE, M. M.; ARANTES, R. M. E.; BARNARD, C. C. A.; TEIXEIRA, M. M.; TAVARES, J. C.; CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis- na intravital microscopy study. **Jornal of Neuroimmunology**, v.162, p.122-129, 2005.

SCOTT, G. S.; BOLTON, C. L-arginine modifies free radical production and the development of experimental allergic encephalomyelitis. **Inflammation Research**, v.49, p.720–26, 2000.

SHEREMATA, W.; TORNES, L. Multiple Sclerosis and the Spinal Cord. **Neurologic Clinics** , V.31, p. 55–77, 2013.

SILVA, A. K. G.; PAULA, M. L.; FERREIRA, A. P. Imunopatologia da encefalomielite auto-imune experimental murina mediada por linfócitos T. **HU Revista**, v.34, n.3, p.205-12, 2008a.

SILVA, A. K. G. **Avaliação do efeito imunomodulador do 17  $\beta$ -Estradiol na Encefalomielite Auto-imune Experimental murina**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010b.

SONG, W.; GWAN, L. Genome-wide pathway analysis of a genome-wide association study on multiple sclerosis. **Molecular biology reports**, v.40, p.2557-64, 2013.

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

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.

TAGO, M. F.; NAKAMURA, K. ; TSURUYA R. A; HATANAKA, M.; MASHINO, T.; SONODA, Y. ; KASAHARA ,T. The fixed structure of Licochalcone A by  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation. **International Immunopharmacology**, v.10, p.562–571, 2010.

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.

TILBERY, C.P. Esclerose Múltipla no Brasil: aspectos clínicos e terapêuticos .São Paulo : **Atheneu**, 2005.

UDOMPATAIKUL, M. e SRISATWAJA W. Comparative Trial of moisturizer containing licochalcone A VS. Hydrocortisone lotion in the treatment of childhood atopic dermatitis: a pilot study. **Journal of the European Academy of Dermatology**, v.25, n.6, p.660-5, 2011.

VEIGA Jr, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 248-54, 2007.

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

VIRLEY, D. J. Developing therapeutics for the treatment of multiple sclerosis. **American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v.2, p.638-49, 2005.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.5, p.137-146, 2012.

YANYING, Z.; BINGJIE, G.; XIAOHUI, J.; XINSHENG, D.; CHUNJIE, S.; FEICHI, W. Sinomenine, na antirheumatic alkaloid, ameliorates clinical sings of disease in the Lewis rat modelo f acute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p.1438-44, 2007.

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.

WANG, Q.; LEE, F. S.; WANG, X.; Isolation and purification of inflacoumarin A and licochalcone A from licorice by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1048, p.51–57, 2004.

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.34605–10, 2007.

WEINER, H.L. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease. **Annals of Neurology**, v.65, p:239-48, 2009.

WON, S.; KIM, S.; KIM, Y.; LEE P.; RYU, J.; KIM, J.; RHEE, H.; Licochalcone A: A lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. **Food Research International**. v.40, p. 1046–50, 2007.

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.967–74, 2007.

**ANEXO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA**  
**Comissão de Ética na Experimentação Animal**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 039/2010 – CEEA sobre “AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LICOCHALCONA-A E *TRANS-CARIOFILENO* SOBRE A ENCEFALITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de JOSÉ OTÁVIO DO AMARAL CORRÊA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 19/11/2010.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 039/2010 - CEEA about “EFFECT OF LYCOCHALCONE-A AND TRANS-CARYOPHYLLENE ON EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS (EAE)” – JOSÉ OTÁVIO DO AMARAL CORRÊA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 19/11/2010.

**Juiz de Fora, 19 de novembro de 2010.**

  
\_\_\_\_\_  
**Presidente/CEEA**  
\_\_\_\_\_  
**Secretário/CEEA**