

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS

Carolina de Lima Alves

**Efeito do partenolido sobre a encefalomielite autoimune experimental (EAE)
induzida em camundongos C57Bl/6**

Juiz de Fora

2020

Carolina de Lima Alves

Efeito do partenolido sobre encefalite autoimune experimental (EAE) induzida em camundongos C57Bl/6

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - área de concentração em Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, para obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

Coorientadora: Prof. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Juiz de Fora

2020

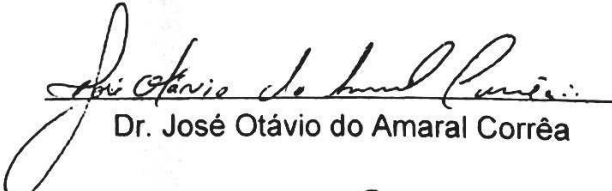
Carolina de Lima Alves

**Efeito do partenolido sobre a encefalomielite autoimune experimental (EAE)
induzida em camundongos C57Bl/6**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - área de concentração em Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, para obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em 07 de outubro de 2020

BANCA EXAMINADORA


Dr. José Otávio do Amaral Corrêa


Dr. Olavo dos Santos Pereira Junior


Dr. Rodrigo Guerra de Oliveira

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1	Formas clínicas da esclerose múltipla	18
Figura 2	Vias de diferenciação de linfócitos TCD4+	23
Figura 3	Patogênese da Esclerose Múltipla	25
Figura 4	Proteínas antigênicas da banha de mielina.....	27
Figura 5	Estrutura química do partenolido	30
Figura 6	Cassetes histológicos contendo os órgãos em parafina	36
Figura 7	Esquema de desparafinização e hidratação dos cortes histológicos	36
Figura 8	Lâminas incubadas com anticorpo.....	38
Figura 9	Sequência em reações em imunohistoquímica	39
Figura 10	Interface do programa Zeiss indicando como é realizada a análise semi-automática das células	41
Figura 11	Esquema sequencial do trabalho realizado.....	42
Figura 12	Presença de infiltrado inflamatório observada através da coloração de hematoxilina e eosina para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula) e separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com a dose de 5,0 mg/Kg/dia de partenolido).....	46
Figura 13	Expressão de <i>i</i> NOS determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula), separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido.....	51
Figura 14	Expressão de T-bet determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula), separados por grupos (controle	

	negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido.....	52
Figura 15	Expressão de GATA-3 determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula), separados por grupos (EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido).....	55
Figura 16	Expressão de IL-17 determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula), separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido).....	58
Figura 17	Expressão de TGF- β 1 determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula), separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido).....	61
Figura 18	Expressão de TGF- β 2 determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula), separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido).....	64

GRÁFICOS

Gráfico 1	Quantificação de leucócitos por campo microscópico (400x) em cortes corados por hematoxilina e eosina, em amostras do SNC: cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. Resultados expressos em média aritmética simples \pm desvio padrão.....	47
Gráfico 2	Porcentagem de células expressando <i>i</i> NOS no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os	

	dados são apresentados em média \pm desvio padrão.....	50
Gráfico 3	Porcentagem de células expressando T- bet no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão.....	53
Gráfico 4	Porcentagem de células expressando T- bet no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão.....	56
Gráfico 5	Porcentagem de células expressando IL-17 no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão	59
Gráfico 6	Porcentagem de células expressando TGF- β 2 no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão.....	62
Gráfico 7	Porcentagem de células expressando TGF- β 1 no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão.....	65

TABELA

Tabela 1	Modelos da Esclerose Múltipla Autoimune.....	28
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- BHE - Barreira hematoencefálica
- APC - Célula Apresentadora de Antígeno
- CFA- Adjuvante Completo de Freud
- EAE - Encefalomielite autoimune experimental
- ELISA - Ensaio imunoenzimático
- EM - Esclerose múltipla
- FoxP3 - Fator de transcrição envolvido em respostas imunitárias adquirida
- GATA - Fator de transcrição
- HE - Hematoxilina e eosina
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- ICAM - Molécula de adesão intracelular
- VCAM - Molécula de adesão vascular
- LFA1 - Função do linfócito associado ao antígeno 1
- MHC I - complexo principal de histocompatibilidade classe I
- MHC II - complexo principal de histocompatibilidade classe II
- NK - Natural Killer
- IL - Interleucina
- i*NOS - Óxido nítrico-sintase induzível
- IFN-β - Interferon beta
- IFN-γ - Interferon gama
- MBP - Proteína básica de mielina
- MOG - Glicoproteína associada ao oligodendrócito
- NF-κB - Fator nuclear kappa B
- NO - Óxido nítrico
- PLP - Proteolípídeo da mielina
- PBS - Salina tamponada com fosfato
- RORγ 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- β - Fator estimulante de colônia de granulócitos beta (transforming growth factor)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor-alpha)

S1P - receptores da esfingosina-1-fosfato

LCR - Líquido cefalorraquidiano

PH - Partenolido

DMT- Terapia modificadora da doença

PN - Produto Natural

EM-RR- Esclerose múltipla remitente recorrente

EM-PP- Esclerose múltipla primária progressiva

EM-SP- Esclerose múltipla secundária progressiva

EM-PR- Esclerose múltipla progressiva recorrente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
	2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA	15
	2.2 IMUNOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA	21
	2.3 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)	26
	2.4 PRODUTOS NATURAIS E NOVOS TRATAMENTOS.....	29
3	OBJETIVOS	33
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAL E METODOS	34
	4.1 PROCEDIMENTO DE INDUÇÃO DA EAE E ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	34
	4.2 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	35
	4.3 DESPARAFINIZAÇÃO	36
	4.4 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA: HEMATOXILINA E EOSINA	37
	4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA	37
	4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	40
	4.6.1 Avaliação microscópica descritiva e histomorfométrica.....	40
	4.6.2 Avaliação <i>in situ</i> da expressão dos anticorpos: anti-iNOS, anti-T bet, anti-GATA3, anti-IL17, anti-TGFβ1 e anti- TGFβ2.....	40
	4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
	4.8 RESUMO DAS ATIVIDADES.....	41
5	RESULTADOS	43
	5.1 HEMATOXILINA E EOSINA	43
	5.2 IMUNOHISTOQUÍMICA	48
	5.2.1 – Expressão de <i>iNOS</i> no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido	48

5.2.2 – Expressão de T- bet no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido	51
5.2.3 – Expressão de Gata-3 no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido	54
5.2.4 – Expressão de IL-17 no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido	57
5.2.5 – Expressão de TGF β -1 no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido	60
5.2.6 – Expressão de TGF β -2 no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido	63
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	79
REFRÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neuroinflamatória que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC). Apesar da origem imunopatológica, possui também um fator genético, que quando associado a um fator ambiental, como por exemplo o contato prévio com alguns tipos de vírus, resulta no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Isso permite, segundo a literatura, que antígenos anteriormente desconhecidos sejam apresentados ao sistema imune (COMINI-FROTA et. al, 2016).

Como consequência dessa alteração é gerada uma resposta inflamatória mediada por linfócitos T. Algumas dessas células, capazes de sobreviver ao controle tímico durante a seleção negativa por deleção clonal, e que apresentam receptores para componentes do SNC, são ativadas (HANDEL; IRANI; HOLLANDER, 2018).

Dessa forma, os linfócitos que foram ativados, sofrem quimioatração para o SNC, atravessando a BHE (COMINI-FROTA et. al, 2016). Por fim, essas células começam a reagir à presença dos antígenos, resultando em processos de desmielinização, dano axonal e morte de neurônios e de oligodendrócitos (XIAO et. al, 2018)

Os dados epidemiológicos mostram que a EM afeta com maior frequência jovens adultos, sendo que pessoas do sexo feminino são duas vezes mais acometidas que pessoas do sexo masculino. No ano de 2016 a prevalência mundial foi de 30.1 casos a cada 100 000 habitantes (WALLIN et. al, 2019).

A doença tem grande importância na prevalência de países do hemisfério norte, como Japão, Canadá e Estados Unidos. Sendo que nos dois últimos, foram registrados mais de 100 casos por 100.000 habitantes (BATALHOTE, 2017). No Brasil, segundo dados fornecidos pelo ministério da saúde, há uma incidência de aproximadamente 15 casos para cada 100.000 pessoas (BRASIL, 2018).

A EM é uma doença que apresenta aspectos clínicos diferentes, atualmente sendo classificada em quatro diferentes tipos de acordo com a presença ou ausência de picos e remissões de sintomas. Sendo assim, é classificada como: recorrente-remittente, na qual o quadro clínico apresenta piora e melhora sem permanecer

nenhuma sequela; progressiva secundária, estado em que o paciente apresenta picos sintomáticos, seguidos por melhora clínica, porém apresentam sequelas provenientes do período de surto; progressiva primária, caracterizada pela presença de um curso clínico com piora progressiva do paciente, sem período de remissão e progressiva recidivante, em que o quadro clínico manifesta piora progressiva, apresentando picos de piora dos sintomas (NEVES et. al 2017).

Atualmente, não existe abordagem terapêutica para curar a EM, mas alguns medicamentos são empregados a fim de reduzir a frequência e a gravidade das recaídas referente aos períodos de surto (TORKIDSEN; MYHR; BO, 2015). Essas drogas são chamadas de terapias modificadoras da doença (DMTs) e são compostas por substâncias imunomoduladoras. Essa terapia, muitas vezes é usada em associação com drogas anti-inflamatórias (COHAN et. al, 2018).

No entanto, as DMTs são mais eficazes nas fases iniciais do desenvolvimento da EM, pois, quando os sintomas evoluem para a doença progressiva, de caráter degenerativo, não existe tratamento com eficácia comprovada. Além disso, também não promovem diretamente o reparo da bainha de mielina (YU; LIU; HU, 2019).

Dessa maneira, os medicamentos objetivam retardar o primeiro estágio da doença, evitando assim, atingir a etapa degenerativa. Além disso, a falta de um padrão na manifestação de sintomas dificulta a escolha dos medicamentos e, por consequência, o sucesso do tratamento (COMINI-FROTA et. al, 2016). Ademais, as DMTs são drogas de possuem um alto custo e ocasionam sérios efeitos adversos (WALLIN et. al, 2019).

Pelo exposto anteriormente, a busca por novas terapias deve ser uma constante (YU; LIU; HU, 2019). Modelos animais são utilizados como uma ferramenta para estudar a fisiopatologia e testar novos tratamentos para a EM. A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o modelo animal mais difundido para mimetizar a doença (LIU et. al, 2018). A EAE pode ser induzida em diferentes espécies de mamíferos, no entanto as características clínicas da doença são modificadas de acordo com a linhagem genética do animal, a fonte do material antigênico e o modo de aplicação do antígeno (BATALHOTE, 2017).

A EAE pode ser induzida de duas formas distintas, sendo assim, classificada em EAE ativa e passiva. A EAE ativa é caracterizada pela presença da fase indutora e efetora da doença. O animal sofre imunização subcutânea com uma emulsão de peptídeos mielínicos, como a proteína oligodendrocítica da mielina (MOG), adjuvante completo de Freund (CFA), (TERRY; INFERGAN; MILLER, 2016), *Mycobacterium tuberculosis* e Toxina *Pertusis*. Já a EAE passiva mimetiza somente a fase efetora da doença. Um animal *naive* recebe linfócitos Th1 CD 4+ adotivos retirados do baço ou linfonodo de um doador previamente sensibilizado contra proteínas do SNC. Nesse modelo, a doença é mais acelerada e uniforme (BATALHOTE, 2017; TERRY; INFERGAN; MILLER, 2016).

Este modelo é o mais aceito para mimetizar a EM por possuir semelhanças no quadro clínico e histopatológico. Além disso, possuem processos fisiopatológicos mediados por células Th1 e Th17 (LIU et. al, 2018). A produção de citocinas pró-inflamatórias como o interferon gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 17 (IL-17) e o óxido nítrico (NO) são mediadores inflamatórios típicos destes perfis celulares (ZHANG et. al, 2017).

Estudos recentes têm usado o EAE para testar substâncias consideradas como protótipos para a produção de novos medicamentos. Alguns exemplos são: o ostol, uma cumarina proveniente do *Cnidium monnier*, com potente atividade anti-inflamatória, a berberina, um alcaloide isoquinolínico, extraída de espécies *Berberis*, a licochalcona, chalcona proveniente da *Glycyrrhiza sp.*, entre outros. Essas substâncias têm ação imunomoduladora, inibindo a produção de mediadores inflamatórios (CARVALHO, 2015).

Esses produtos de origem natural são muito utilizados desde a antiguidade para obtenção de substâncias potencialmente ativas para o organismo. Muitas dessas substâncias que foram descobertas durante os anos ainda têm grande importância na terapêutica, como a morfina, proveniente da *Papaver somniferum*, importante analgésico (ZHANG et. al, 2019); os salicilatos obtidos da *Salix alba*, que deu origem ao ácido acetil salicílico, utilizado como analgésico e antipirético (MAISTRO et. al, 2020); a vincristina e vimblastina, isoladas da *Catharrantus roseus*; e o taxol, extraído da *Taxus brevifolia*, todos esses empregados como agentes quimioterápicos (SECA; PINTO, 2018). Há, também, estudos recentes mostrando atividade de produtos

naturais para o tratamento da EM, utilizando o modelo EAE, como é o caso do fingolimode. (ZHANG, 2017).

Uma outra substância de origem natural é o partenolido, uma lactona sesquiterpênica, que apresenta atividade biológica. É considerado o marcador da espécie *Tanacetum parthenium*. O extrato dessa planta é utilizado como medicamento fitoterápico de notificação simples para a profilaxia da enxaqueca. Seu uso é regulamentado pela ANVISA (SILVERIO, 2016). Além disso, demonstrou ser uma substância promissora por ter atividades anti-inflamatórias e anti-câncer (FREUND et. al, 2019).

Sabe-se que seu uso para enxaqueca e dor reumática está associado a neuropatias provenientes de uma resposta inflamatória. Esta substância também diminui a hiperalgia do nervo ciático. Estudos *in vitro* sugerem que o partenolido interfere em diversas vias celulares importantes como: a do fator nuclear-kappa B (NF- κ B), inibindo a expressão de certas citocinas; a do sinal de transdutores e ativadores de transcrição (STAT's), a do fator de transcrição envolvido na diferenciação da resposta Th17, e a de MAP quinases. Além disso, influencia a micróglia, a ativação de macrófagos na medula de ratos e fatores pronociceptivos espinhais (IL-1 β , IL-6, IL-18 e *i*NOS) e antinociceptivos (IL-10 e TIMP1) (POPIOLEK-BARCKZYK, 2015).

Contudo, sabe-se da importância da Esclerose Múltipla como doença que atinge indivíduos jovens em várias partes do mundo, e a necessidade da busca de um tratamento efetivo (YU; LIU; HU, 2019). A bioprospecção de produtos naturais é uma das maneiras de encontrar novas moléculas com atividades biológicas importantes (ANGELONI; VAUZOUR, 2019). Além disso, sabe-se da relação do partenolido com neuropatias associadas a processos inflamatórios, sendo um indício para uma possível atividade em doenças como a EM.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla é uma doença multifatorial crônica que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC). É caracterizada pela presença de um processo inflamatório autoimune que gera a formação de tecidos cicatriciais, denominadas placas escleróticas, as quais impedem a propagação adequada do impulso nervoso, culminando em perdas permanentes ou transitórias das funções do mesmo (PIMENTEL; TOLDRÁ, 2017).

Essas lesões acometem mais especificamente a substância branca periventricular, a medula cervical, o tronco cerebral e o nervo óptico. Ocorrem alterações como desmielinização, gliose, danos axonais, astrocitose, causadas pela infiltração de linfócitos T e B, e ativação da micróglia. Embora a etiologia desta doença ainda seja desconhecida, acredita-se que estão envolvidos componentes genéticos em associação à fatores ambientais que resultam no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (GORIS, 2015).

Essa modificação da BHE permite a apresentação de antígenos anteriormente desconhecidos ao sistema imune. Entre eles estão: a alfa-enolase, a alfa β -cristalina, a β -arrestina, a proteína proteolipídica de proteassomo, a S100-beta, a aquaporina-4, a mielina de oligodendrócito e a proteína básica de mielina. A partir deste momento ocorre a ativação de leucócitos autorreativos para essas substâncias (ERRANTE, 2016).

A EM é uma doença que afeta ambos os sexos. Estima-se que atinja cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo. No entanto, mulheres são duas vezes mais acometidas que homens e caucasianos são mais acometidos que negros (LARUSSA et al., 2015; SIQUEIRA; PIRES, 2016). Além disso, adultos na faixa etária de 18 a 55 anos são comumente mais afetados (SANTOS, 2017; BRASIL, 2018).

Os hormônios sexuais como os estrogênios, a progesterona, os andrógenos e a prolactina apresentam efeitos moduladores do sistema imune. Dessa forma,

influenciam o curso da MS. Esse fato pode explicar o porquê de as mulheres serem mais acometidas pela doença que os homens (VOSKUHL; MOMTAZEE, 2017).

Os estrogênios são os principais hormônios femininos de caráter pró-inflamatório. Neste contexto, existe uma gama de genes responsivos a eles em todas as células da imunidade inata e adquirida. Sendo assim, estas substâncias endógenas são capazes de regular a atividade de vários componentes imunes. Dentre eles estão: os linfócitos B; as citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α , INF- γ e IL-6; e as células da imunidade inata, como os macrófagos e células dendríticas (YSRRAELIT; CORREALE, 2018).

A prevalência mundial para a doença é de 30.1 casos para cada 100.000 habitantes. Entretanto, algumas regiões possuem uma prevalência ainda maior, como: América do Norte (164.6 por 100.000 habitantes), Oeste da Europa (127 por 100.000 habitantes) e Australasia (91.1 por 100.000). Já na América do Sul, há uma prevalência menor, em torno de 22.7 casos por 100.000 habitantes (WALLIN et. al, 2019). Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil há uma incidência de 15 casos para cada 100.000 pessoas (SANTOS, 2017; BRASIL, 2018).

A discrepância em relação a prevalência em diferentes regiões está associada aos fatores ambientais. Esses, por sua vez, podem estar relacionados com diversas fontes, entre elas a relação com à baixa exposição a luz solar e/ou menor nível sérico de vitamina D (FAYYAZI et. al, 2018)

A literatura aponta que níveis séricos de vitamina D mais elevados resultam em uma menor incidência da EM, pois a mesma atua no sistema imunológico sobre diversos mecanismos importantes como: atividade de macrófagos e monócitos; diferenciação e proliferação de linfócitos T, produção de isotipos específicos de anticorpos por linfócitos B; e produção de citocinas (SINTZEL; RAMETA; REDER, 2018).

Além disso, a manifestação da doença também se baseia na exposição às infecções bacterianas e virais, que atuam como gatilhos para o desenvolvimento da mesma. Os agentes mais comuns incluem as bactérias *Chlamydia pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* e, os vírus, Epstein-Barr e herpes vírus humano 6. Eles são

capazes de ativar uma resposta imune por provável mimetismo molecular com proteínas próprias do hospedeiro (MORRADAN et. al, 2019).

Outro fator de risco para a EM é a informação genética. Os genes do Alelo do Complexo Principal de Histocompatibilidade (HLA) são fortemente relacionados aos mecanismos patogênicos da doença. Entretanto, as variantes genéticas podem ter menor peso quando os fatores ambientais e o estilo de vida são controlados, pois, estes, podem atuar como gatilhos para ativação dos genes em questão (OISSON; BARCELLOS; ALFREDSSOM, 2017).

O HLA de Classe II (MHC classe II) está relacionado a susceptibilidade da doença em diferentes populações. Entre eles estão: HLA DRB1*1501, que foram associados à EM na América do Norte e na Europa; o HLA DRB1*1501, HLA DRB1*0301 e HLA DRB1*0401 nos italianos e o haplótipo HLA DRB1*04 em turcos e canadenses. No Brasil, o alelo HLA DRB1*1501 tem sido correlacionado à doença em brancos no Rio de Janeiro (SACRAMENTO et. al, 2018).

A EM se caracteriza por um curso heterogêneo, com sintomas que variam conforme a área afetada, o que gera sintomas físicos, cognitivos e emocionais característicos. Entre esses sintomas, são comuns a fraqueza, incontinência urinária, diplopia, ataxia, dor, disfunções de equilíbrio e de coordenação, entre outros (FILLIS, 2018).

Segundo a evolução clínica, a doença pode ser caracterizada em quatro formas distintas: remitente-recorrente (EM-RR), primária progressiva (EM-PP), secundária progressiva (EM-SP) e progressiva recorrente (EM-PR). Sendo que a forma mais comum é a EM-RR, representando 85% de todos os casos no início do desenvolvimento do quadro clínico, ao passo que a forma EM-SP é uma evolução natural da EM-RR em 50% dos casos após 10 anos do diagnóstico. As formas EM-PP e EM-PR perfazem 10% a 15% dos casos (NEVES, 2017; FILLIS, 2018; BRASIL, 2018).

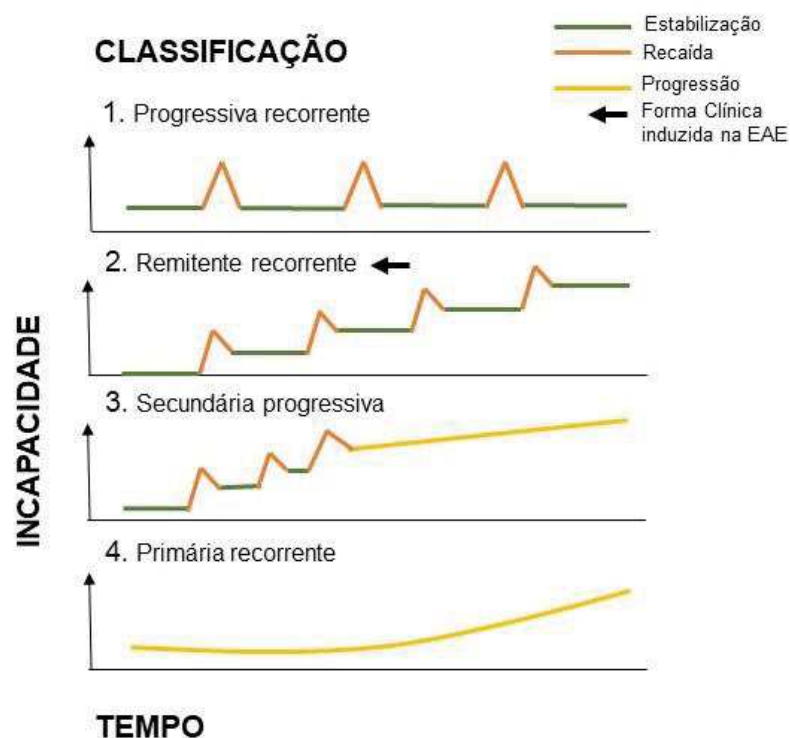
Com base nas informações apresentadas a EM-RR foi a forma clínica utilizada para o presente estudo, uma vez que apresenta o curso clínico mais comum da doença (Figura 1). Essa forma clínica é caracterizada por períodos de surto, nos quais há a ocorrência de danos teciduais como, por exemplo, o processo de desmielinização

no SNC. Esse período é seguido por melhora espontânea dos sintomas, sem a permanência de sequelas, podendo estar presente por vários anos (NEVES et. al, 2017).

O quadro clínico, por sua vez, pode evoluir para a forma secundária progressiva, no qual os períodos de surto passam a ocasionar danos permanentes para o paciente, apesar de poder haver momentos de melhora do quadro (NEVES et. al, 2017). Esses períodos são definidos como eventos reportados pelo doente ou observados, que sejam típicos de um evento inflamatório desmielinizante agudo no SNC, atuais ou retrospectivos, com duração de pelo menos 24 horas, na ausência de febre ou de infecção (MONTEIRO, 2016).

Ademais, a forma primária progressiva apresenta uma progressão mais linear da doença, o qual apresenta períodos de surtos, mas não há um momento de remissão dos sintomas. Por fim, na forma progressiva recorrente, o quadro clínico apresenta piora progressiva atingindo picos de piora dos sintomas (NEVES et. al, 2017).

Figura 1: Formas clínicas da esclerose múltipla



Fonte: modificada: https://www.ademgi.org/?page_id=446

O diagnóstico é estabelecido com base no relato clínico do paciente juntamente com exames físicos. Podem ser adicionados exames complementares como os exames laboratoriais (análise do líquido cefalorraquidiano e hemograma) e os exames neurorradiológicos (ERRANTE, 2016).

Atualmente, o diagnóstico adotado pela comunidade científica é realizado com base na revisão de 2010 dos critérios de McDonald, que utiliza exames clínicos, testes laboratoriais e demonstração de disseminação espacial e temporal das lesões, visualizados através de ressonância nuclear magnética (GORIS, 2015; MONTEIRO, 2016; BRASIL, 2018).

Os tratamentos dos sintomas incluem: medidas não farmacológicas, como reabilitação, modificações no estilo de vida, suporte psicossocial e procedimentos cirúrgicos; e medidas farmacológicas, as quais utilizam-se de medicamentos de primeira, segunda e terceira linha. Essas terapias objetivam o retardo da fase degenerativa da doença, tendo foco no componente inflamatório, sendo denominadas terapias modificadoras da doença (DMT's). No entanto, esses tratamentos mostraram ser apenas parcialmente eficazes para o tratamento da EM (BRASIL, 2018; MARQUES et. al, 2018).

As terapêuticas de primeira linha incluem apresentações farmacológicas do interferon beta-1 β (IFN- β -1 β), interferon beta-1 α (IFN- β -1 α) e acetato de glatirâmer (BRASIL, 2019). O mecanismo de ação do IFN- β ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, acredita-se que possa ocorrer a inibição do desenvolvimento de células Th1, desvio das respostas para o perfil de células Th2, supressão da produção de Interferon-gama (IFN- γ) e indução de IL-10 (OLIVEIRA, 2017).

Já o acetato de glatirâmer é um imunomodulador que reage de forma cruzada com a proteína básica da mielina e liga-se com afinidade às proteínas do Complexo de Histocompatibilidade das células apresentadoras de antígenos. A partir de então ocorre a ativação de células T- supressoras que levam à supressão da doença. Além disso, ocorre a competição com a proteína básica da mielina levando à inibição da proliferação celular autoimune (MARQUES et. al, 2018; ANVISA, 2018).

Além disso, pode ocorrer alteração da expressão de moléculas envolvidas no tráfego através da barreira hematoencefálica (BHE), restaurando esta barreira;

supressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II induzidas pelo IFN- γ nas células do SNC e indução de mudanças na expressão do fator neurotrófico, resultando em um possível efeito neuroprotetor (OLIVEIRA, 2017).

Já os medicamentos utilizados na terapêutica de segunda linha envolvem aqueles de primeira linha que ainda não foram escolhidos e, também, abrange, dentre as possibilidades de escolha, a teriflunomida, o fumarato de dimetila e o fingolimode (Brasil, 2019). Todos esses medicamentos apresentam ação imunossupressora, sendo capazes de reduzir a frequência de recaídas e a progressão da incapacidade na EM-RR (LORSCHIEDER, 2018).

A terapêutica de terceira linha inclui, especificamente, o Fingolimode. Essa substância é capaz de, após sua fosforilação, agir sobre receptores para a esfingosina 1-fosfato (S1P), um mediador lipídico extracelular. Existem 4 subtipos de receptores S1P, conhecidos como subtipos S1P1, 3, 4, 5, que se ligam ao fingolimod-fosfato. Esses receptores são expressos em células envolvidas em processos biológicos da EM. O S1P1 desempenha um papel fundamental no sistema imunitário, regulando a saída de linfócitos dos tecidos linfoides para a circulação. Além disso, o fingolimode atravessa a barreira hematoencefálica e pode, portanto, ter efeitos diretos sobre o SNC (CHUN et. al, 2019).

Por fim, o tratamento de quarta linha emprega o uso do natalizumab (Brasil, 2019). Esse medicamento é o primeiro de uma classe de DMT's conhecidos como inibidores da molécula de adesão seletiva e atua impedindo os eventos inflamatórios específicos que levam ao desenvolvimento de lesões na EM. Células endoteliais presentes no lúmen dos vasos sanguíneos expressam a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) em locais de lesões ativas. Essa molécula interage com a α 4 β 1-integrina, para que possa ocorrer os processos de adesão, fixação e transmigração de leucócitos através da BHE para o SNC. Natalizumab é um anticorpo recombinante, humanizado, que se liga a α 4 β 1-integrina e bloqueia a sua interação com VCAM-1. Como resultado, a migração de leucócitos para o tecido cerebral é inibida, reduzindo a inflamação e prevenindo a formação de lesões (CLERICO et. al, 2017).

Alguns estudos apontam, ainda, uma abordagem terapêutica empregando a mitoxantrona, um quimioterápico, também utilizado como DMT's. Estudos mostram

que esse fármaco também é capaz de reduzir as recaídas e retardar a progressão da EM (FOO; RUSSEL; FORD, 2020). Além disso, os glicocorticoides, que apresentam atividade anti-inflamatória e imunossupressora, também podem ser utilizados. O uso do mesmo é recomendado a fim de tratar ataques agudos dos períodos de surto. Esta abordagem é denominada de terapia de impulso (SONG et. al, 2020).

Além do exposto, têm surgido teorias sobre a utilização de células tronco, nas quais o sistema imune do paciente seria eliminado e substituídos por novas células. No entanto não é algo promissor, uma vez que pode oferecer riscos para a vida do doente, além de atrair muitos produtos antiéticos e não licenciados para o mercado (BRORY, 2016).

Dessa forma, os medicamentos apresentados visam atingir os sintomas iniciais da doença, cujo quadro clínico característico é a presença predominante de inflamação, sendo assim, quando os sintomas evoluem progressivamente, de maneira degenerativa, não existe um tratamento totalmente eficaz (YU; LIU; HU, 2019).

Portanto, a busca por novos tratamentos para a doença deve ser uma constante, pois, além de não haver um tratamento eficaz, a doença é responsável pela incapacitação de jovens e adultos em todo o mundo. Além disso, os fármacos utilizados na terapia apresentam fortes efeitos adversos e custos elevados, ressaltando a importância de novos estudos na área (WALLIN et. al, 2019).

2.2 IMUNOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

O Sistema imune é um componente fisiológico que é capaz de diferenciar o que é “próprio” e “não próprio”. Essa característica protege o organismo contra a presença de patógenos. Esse controle é feito através de dois tipos de imunidades: a inata e a adquirida. A imunidade inata faz uso de um enorme conjunto de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que irão reconhecer moléculas associadas aos patógenos, sendo mediados por células fagocitárias (HUANG; CHEN, 2016).

Já a imunidade adquirida é caracterizada pelas respostas de linfócitos T e B, que são células produzidas na medula óssea. As células T precisam ir até o timo, órgão no qual será concluído o processo de diferenciação celular. As células T irão

apresentar receptores específicos para cada tipo de antígeno, enquanto células B irão produzir as imunoglobulinas (HUANG; CHEN, 2016).

As células T são divididas em duas classes. Células TCD4+ e TCD8+. As primeiras são ativadas por peptídeos apresentados por moléculas do Complexo de Histocompatibilidade de Classe II (MHC II), enquanto as do segundo tipo são acionadas por meio do MHC Classe I (BORGES et. al, 2017).

A esclerose múltipla é mediada pelos linfócitos T autorreativos. Foram descritos, mais especificamente, a população de linfócitos TCD4+. No entanto, linfócitos TCD8+ também participam dos mecanismos de desmielinização, tanto pelo efeito citotóxico, quanto pela função imunoreguladora. A população de linfócitos TCD4+ apresenta grande heterogeneidade quando se avalia os subtipos que são expressados. Entre eles: Th1, Th2, Treg e Th17 que são os grandes responsáveis pela produção de citocinas. Essas, por sua vez, norteiam o processo inflamatório que ocorre na EM (MORAES, 2017).

Quando uma célula apresentadora de antígeno (APC) apresenta o determinante antigênico ao linfócito *naive*, via MHC de Classe II e na presença de IL-12, é favorecida a resposta do tipo Th1. Este, por sua vez, será o responsável por produzir citocinas pró-inflamatórias, principalmente o IFN- γ , que irá circular pelo corpo até atravessar a BHE onde atua aumentando o processo inflamatório no SNC através da ativação e do recrutamento de macrófagos. Essas células fagocitárias irão, então, aumentar a produção de TNF- α (GOBEL; RUCK; MEUTH, 2018).

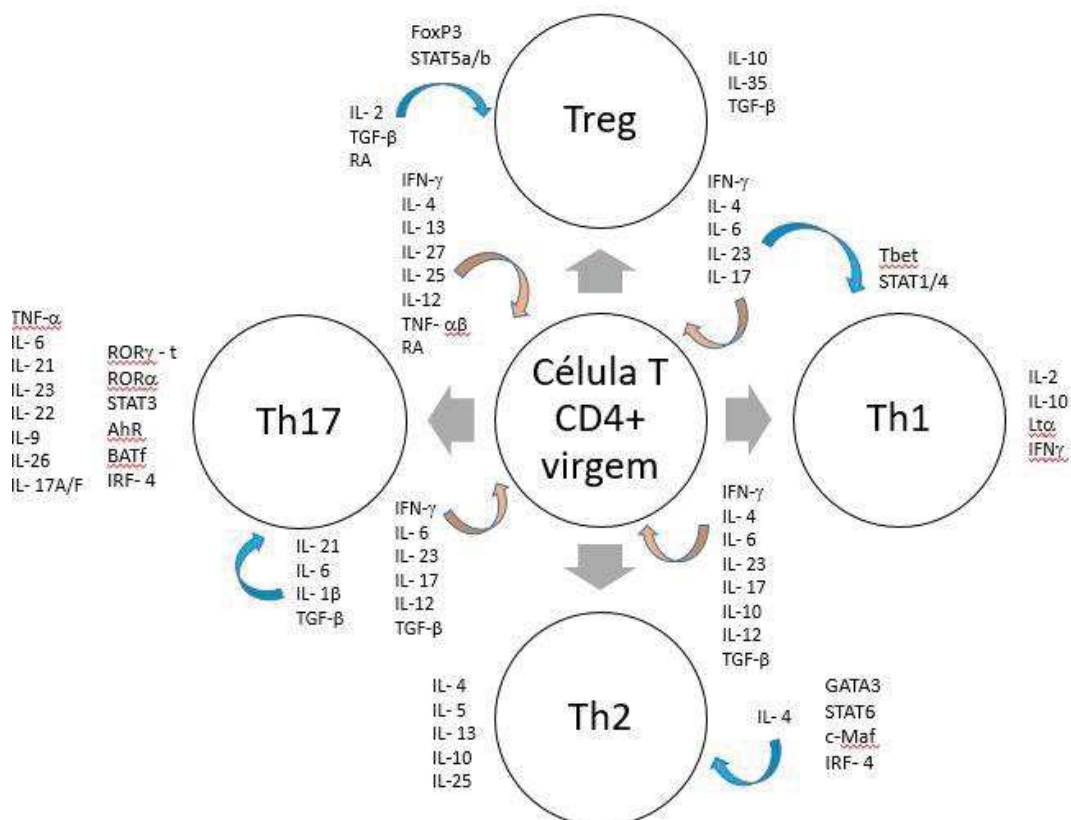
A APC é o componente que determina qual tipo de resposta será favorecida utilizando-se da produção de citocinas pró- inflamatórias. Caso seja liberada IL-4, o linfócito *naive* irá se diferenciar no subtipo Th2. Esta célula será responsável pela produção de outras citocinas, dentre elas a IL-10, importante para controlar a patogênese da EM, por ser capaz de inibir a produção destas interleucinas pró-inflamatórias (GOBEL; RUCK; MEUTH, 2018).

Em contrapartida, para a diferenciação em células Th17 é necessária a presença das citocinas IL-6 e TGF- β . Estas células são geralmente encontradas em áreas inflamadas, juntamente com as células Th1, sendo responsáveis pelo processo de desmielinização (MORAES, 2017).

Por outro lado, para que ocorra a diferenciação celular para o perfil Treg Foxp3+ devem ser secretadas, principalmente, IL-10 e TGF- β . Esse subtipo é caracterizado por controlar o processo inflamatório, podendo inibir a resposta inflamatória Th17 por meio da via de repressão do fator de transcrição ROR γ T (DANIKOWSKI; JAYARAMAN; PRABHAKAR, 2017).

Como abordado anteriormente, o perfil de citocinas produzido que determina o tipo de resposta. Isso ocorre, pois, elas são capazes de ativar os fatores de transcrição necessários para a diferenciação de cada subtipo de célula T. Para o subtipo Th1 ocorre a ativação dos fatores de transcrição T-bet e STAT4, para o Th2, ocorre a ativação dos fatores de transcrição GATA3 e STAT5, enquanto que para a linhagem Th17 são ativados STAT3 e ROR γ T. Por fim, para a diferenciação em linfócitos Treg ocorre a ativação dos fatores de transcrição FOXP3 e STAT5 (FONTES, 2013).

Figura 2: Vias de diferenciação de linfócitos TCD4+



Fonte: Modificada de JADIDI-NIARARAGH; MIRSHAFIEY, 2011.

A ativação do sistema imune tem início nos tecidos periféricos, e pode ser resultado de reação cruzada direta ou de mimetismo molecular. Em seguida, ocorre a

migração dos linfócitos T para os nódulos linfáticos, onde alguns desses, juntamente com células B infiltram o SNC, onde irá ocorrer a liberação de mediadores inflamatórios, que irão romper a BHE e atrair grande quantidade de fagócitos e linfócitos, culminando assim no processo de desmielinização e danos neurológicos (ZÉPHIR, 2018). A migração dessas células para o SNC só é possível devido ativação de moléculas de adesão intercelular (ICAN-1) e vascular (VCAM-1) (CLERICO et. al, 2017).

A fisiopatologia da EM é caracterizada pela presença de um perfil de resposta celular. A população TCD4 origina os subtipos Th1, Th2 e Th17, porém, as respostas Th1 e Th17 são as principais causadoras dos danos teciduais encontrados nesse distúrbio autoimune. Além disso, há também, o subtipo celular Treg que atua como um regulador do processo inflamatório, com a finalidade de reduzir os danos excessivos ocasionados pelos demais componentes (SALEHI et. al, 2016).

Essas células regulatórias podem operar por diferentes mecanismos. Entre eles estão a supressão por contato físico entre células Treg e CD4 efetora, inibindo a célula T ativada, a produção de substâncias inibitórias como a IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β 1). E, por fim, por atividade citotóxica no qual os linfócitos Treg liberam granzimas e perforinas levando à citólise da célula-alvo (GLIWINSKI; IWASZKIEWICZ-GRZES; TRZONKOWSKI, 2017).

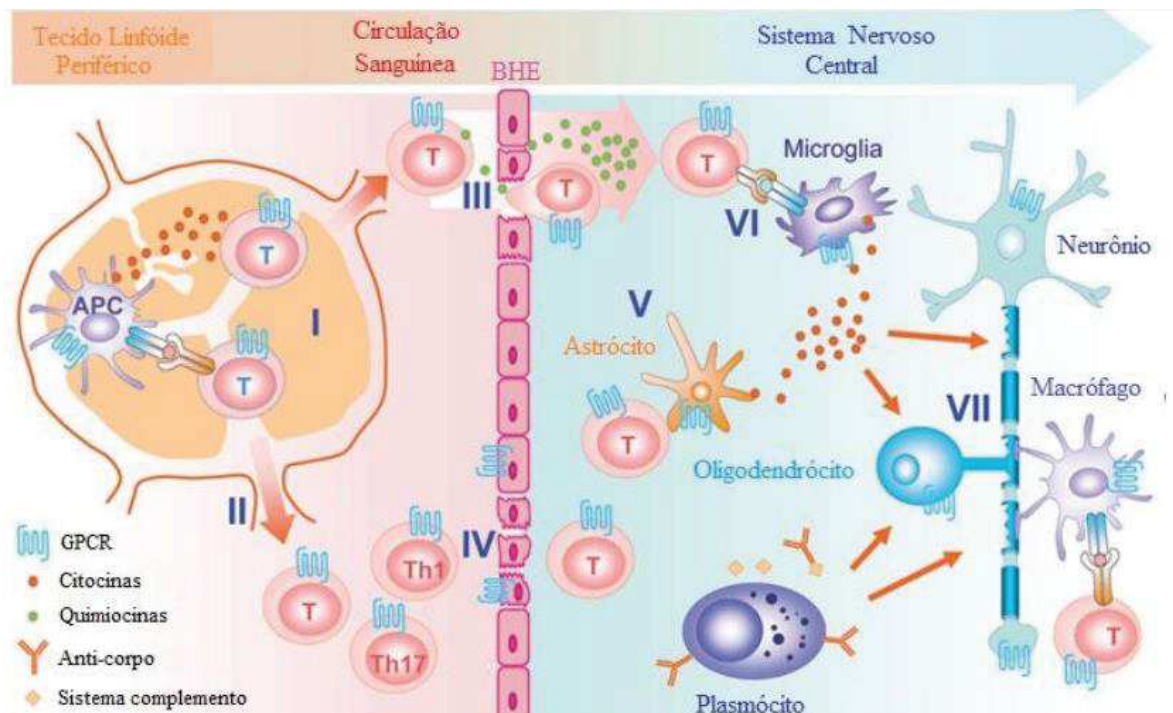
Além disso, também estão envolvidas na patogênese da EM as células TCD8+, que encontram-se localizadas, principalmente, nas lesões dos neurônios e na região perivascular. Elas interagem com células que expressam o Complexo de Histocompatibilidade da Classe I (MHC I), que é expresso por todas as células nucleadas, formando assim, sinapse imunológica (SABATINO et. al, 2019).

O mecanismo de citotoxicidade do linfócito TCD8+ pode ser mediado pela secreção de grânulos líticos contendo perforina e granzimas, o que leva à apoptose da célula, ou pela interação do Fas ligante (FasL) com Fas que é expressada nos neurônios. Dessa maneira, estes mecanismos são responsáveis pelos efeitos patogênicos das células TCD8+, cronificando o processo de desmielinização (NIEROP et. al, 2017).

Além destas células, os linfócitos B também desempenham papel importante na patogênese da EM, sendo responsável pela produção de anticorpos reagentes aos autoantígenos do SNC (SIQUEIRA; PIRES, 2016).

O processo inflamatório gerado pela migração de células do sistema imune para o SNC culmina na formação de uma cicatriz, denominada esclerose. Esta formação visa conter este processo inflamatório, no entanto ocorre a perda da função tecidual do local. Essas cicatrizes irão aparecer em várias regiões do SNC (CHIQUETTI et. al, 2018). Segue abaixo uma imagem ilustrativa da patogênese da EM.

Figura 3: Patogênese da Esclerose Múltipla I: apresentação de antígeno pelas APC II: proliferação e diferenciação de células T efetoras, III: liberação de citocinas favorecendo a migração e infiltração de células T para o SNC, IV: aumento da permeabilidade da BHE pelas moléculas de adesão celular, V: células T efetoras ativam astrócitos a liberarem citocinas pró-inflamatórias, VI: microglia apresenta fragmentos de mielina aos linfócitos T efetores reativando-os no SNC, VII: processo de desmielinização envolvendo perda de oligodendrócitos e dano axonal. GPCR: receptor das células imunes acoplado à proteína G.



Fonte: JUNQUEIRA, 2015

2.3 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

Com o objetivo de estudar a Esclerose Múltipla, podem ser utilizados modelos animais que possuam um seguimento patológico semelhante ao da doença. Nenhum desses modelos são capazes de replicar todos os estágios da EM. Dessa forma, cada um deles apresentam vantagens e desvantagens em sua utilização. A maioria destes, são capazes de gerar processos de desmielinização semelhantes ao da EM, podendo ser induzidos por vírus ou toxinas (BJELOBABA et. al, 2018). O modelo, até então, mais difundido e aceito para este fim, é a encefalomielite autoimune experimental (SANTOS, 2017).

No entanto, diferentemente da EM, a EAE se desenvolve a partir de uma imunização externa, com antígenos ou linfócitos ativados, ao passo que a EM se desenvolve naturalmente no indivíduo. Essa diferença é uma desvantagem do modelo, pois dificulta o estudo das características iniciais da patologia (JUNQUEIRA, 2015). A imunização externa pode ocorrer de duas maneiras, sendo elas de forma ativa, através de componentes da bainha de mielina, ou de forma passiva, através da transferência de linfócitos TCD4+ sensibilizados a esses componentes (BJELOBABA et. al, 2018).

As proteínas presentes na mielina são caracterizadas como os autoantígenos da doença, e são responsáveis pela ativação da produção dos autoanticorpos. Alguns exemplos são: a proteína básica da mielina (MBP), o proteolípídeo da mielina (PLP), a glicoproteína de oligodendrócitos associado a mielina (MOG) (GLATIGNY; BETTELLI, 2018).

Além disso, também é necessário o uso de outras substâncias, como o adjuvante completo de Freund (CFA), o *Mycobacterium tuberculosis* e a Toxina *Pertusis*, que atuam aumentando a resposta inflamatória gerada (TERRY; INFERRAN; MILLER, 2016).

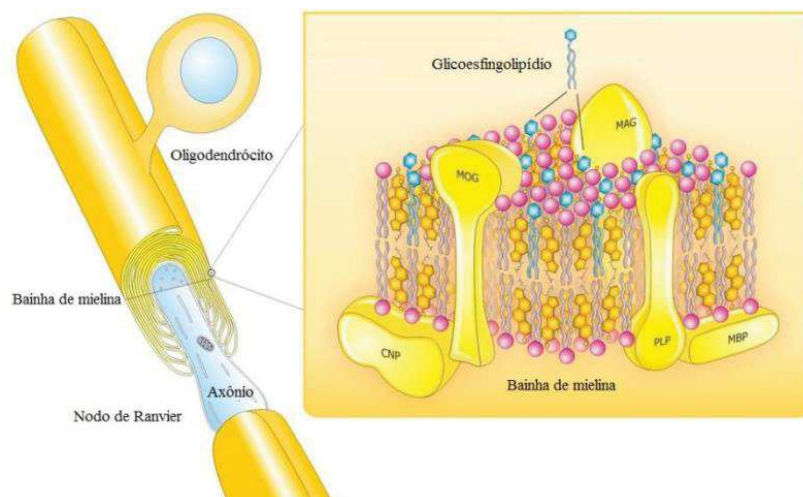
Existem variações do modelo EAE, pois, podem ser utilizados diferentes tipos de linhagens de animais, e diferentes formas de indução. O primeiro modelo reconhecido de EAE foi um modelo em primata, utilizando o macaco Rhesus, no ano de 1935. Os pesquisadores Rivers e Schwentker, induziram a EAE com imunizações

repetidas, utilizando extrato de cérebro de coelho, sem o uso de coadjuvantes. No entanto, esse modelo, apresentou algumas características distintas da doença no humano (GLATIGNY; BETTELLI, 2018).

Com o decorrer dos anos, passaram a ser utilizados vários outros tipos de animais, sendo que os roedores (camundongos, ratos, porquinhos da índia) ou primatas não humanos foram identificados como susceptíveis à indução ativa da EAE por via subcutânea, podendo ser empregado para o estudo da EM (BJELOBABA et. al, 2018).

Entre estas formas de indução, tem sido muito utilizada a imunização de camundongos da linhagem C57BL/6 pelo peptídeo MOG. Esse modelo é caracterizado pelo processo de desmielinização e lesões do nervo óptico e da substância branca do cérebro e medula, sendo mediado por células Th1 e Th17. Além disso, podem ser utilizados camundongos geneticamente modificados, capazes de apresentar uma maior resposta imune, apresentando uma forma mais grave da doença (JUNQUEIRA, 2015). Segue abaixo uma imagem ilustrativa das proteínas antigênicas da bainha de mielina dos neurônios do SNC.

Figura 4: Proteínas antigênicas da bainha de mielina



Fonte: JUNQUEIRA, 2015

Dessa forma, conclui-se que as características clínicas do modelo dependem de muitas variáveis como o antígeno escolhido, o tipo de coadjuvante utilizado, a espécie, estirpe, sexo e idade dos animais. As manifestações da doença iniciam-se por um processo de paralisia ascendente, com início da cauda, passando por

membros posteriores, podendo chegar à um quadro de tetraplegia. No entanto, o curso clínico pode ocorrer de forma aguda monofásica, crônica ou remitente-recorrente (DIAS, 2016). O presente trabalho utilizou o modelo destacado abaixo por apresentar o curso clínico mais comum da EM nos humanos. Segue abaixo uma tabela com os modelos clássicos da EAE.

Tabela 1: Modelos da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

Curso da doença	Animal	Antígeno	Linhagem
Remitente-recorrente	Camundongo	PLP: 139-151	SJL/J
 Remitente-recorrente	Camundongo	Baixa dose MOG: 35-55	C57BL/6
Remitente-recorrente	Rato	MOG: 1-125	Dark agouti
Crônica	Camundongo	MOG: 35-55	C57BL/6
Crônica	Camundongo	PLP:178-191	C57BL/6
Crônica	Camundongo	MP4	C57BL/6
Crônica	Rato	MOG	Lewis N1
Aguda Monofásica	Camundongo	PBM	B10.BL
Aguda Monofásica	Camundongo	PBM	PL/J
Aguda Monofásica	Rato	PBM	Lewis

Fonte: Adaptado de DIAS, 2016

Por fim, as semelhanças entre o quadro fisiopatológico da EAE com a EM permite o estudo comparativo entre ambas, destacando-se: a debilidade motora, o infiltrado inflamatório e o processo de desmielinização. Sendo assim, esse modelo animal possui características promissoras para o estudo da EM (CHUHUTIN et. al, 2020).

2.4 PRODUTOS NATURAIS E NOVOS TRATAMENTOS

Os produtos de origem natural são muito utilizados desde a antiguidade para obtenção de substâncias potencialmente ativas para o organismo. Essas fontes sempre tiveram um papel importante para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos, fragrâncias, e outros bioprodutos. Isso ocorre, pois apresentam grande diversidade estrutural e de grupos funcionais, sendo os metabólitos secundários os mais estudados para atividade biológica (BOLZANI, 2016).

Muitas dessas substâncias descobertas ao longo dos anos ainda possuem grande importância na terapêutica. Um fármaco muito importante oriundo de produto natural (PN) foi o Taxol, um diterpeno isolado da *Taxus brevifolia*. Este fármaco foi um importante protótipo para a produção de medicamentos antitumorais (SECA; PINTO, 2018). Há, também, estudos recentes mostrando atividade de PN para o tratamento da EM, utilizando o modelo EAE, como é o caso do fingolimode, um fármaco já utilizado como tratamento de segunda linha para a EM (ZHANG, 2017).

Diversas outras substâncias são estudadas e testadas no modelo animal em questão, entre elas, pode-se citar alguns exemplos de moléculas com capacidade imunomodulatória, como o ostol, uma cumarina proveniente do *Cnidium monnier*, com potente atividade anti-inflamatória, a berberina, um alcaloide isoquinolínico, extraída de espécies *Berberis*, a licochalcona, chalcona proveniente da *Glycyrrhiza sp.* entre outras (FONTES, 2014; CARVALHO, 2015).

Além do citado anteriormente, outras plantas tem sido estudadas por sua potencial atividade anti-inflamatória. Entre elas, estão plantas da família Asteraceae, também conhecida como Compositae, que reúne mais de 1.600 gêneros e 23.600 espécies, sendo a segunda maior família existente. No Brasil há aproximadamente 196 gêneros e 1900 espécies pertencentes a esta família, reunindo estudos em diversas áreas, dentre eles estão os estudos morfoanatômicos, os citogenéticos, os fitoquímicos e os farmacológicos (GUERREIRO et. al, 2016).

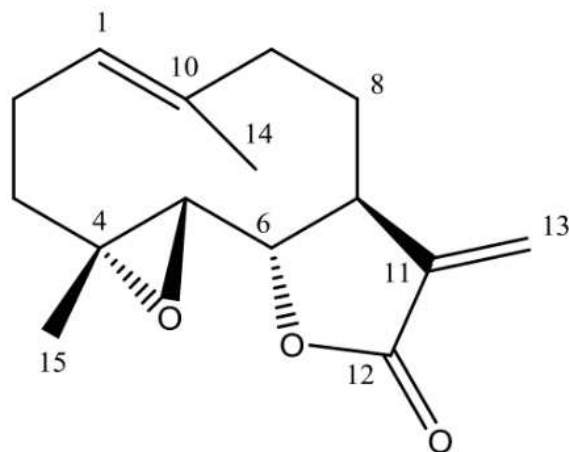
Dentre os importantes gêneros de Asteraceae encontra-se o *Tanacetum* L. Espécies desse gênero são ricas em óleos essenciais e lactonas sesquiterpênicas e têm sido utilizadas popularmente como antiparasitária e para tratar a enxaqueca

POPIOLEK-BARCKZYK, 2015; SILVERIO, 2016). No entanto alguns estudos farmacológicos comprovaram atividade anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica para espécies do gênero. São plantas encontradas principalmente no leste Europeu e Ásia menor, podendo ser encontrados também em alguns países da África e Américas, incluindo o Brasil (GUERREIRO et. al, 2016).

A espécie *Tanacetum parthenium* apresenta um importante marcador, substância denominada partenolido, com potencial atividade anti-inflamatória. É encontrada em maior concentração nas folhas e flores da espécie. Trata-se de uma lactona sesquiterpênica da classe dos germacrolídeos. Sendo assim, é uma molécula proveniente da rota biossintética dos terpenos (OSÓRIO; GARSÍA, 2019).

É uma molécula derivada da união de três unidades de isopreno, que dá origem inicialmente ao germacreno, molécula de 15 átomos de carbono em sua estrutura (SCHEPETKIN et. al, 2018). Essa molécula sofre uma oxidação no C12 e uma hidroxilação no C6 para a formação do anel lactônico, formando assim o partenolido (CARVALHO, 2015). Segue abaixo sua fórmula estrutural.

Figura 5: Estrutura química do partenolido



Fonte: CARVALHO, 2015

Outra importante informação, em relação a esta substância, foi sua propriedade anticancerígena por agir estimulando a apoptose celular (MIGLIO et. al, 2015). Essa propriedade está relacionada com a inibição da via do fator nuclear NF-KB, que está associado à regulação da expressão gênica de diversas citocinas. Além disso, opera sobre o fator de transcrição STAT3, o que controla a resposta celular Th17. Sendo

assim, o partenolido é uma molécula promissora para a modulação da resposta imune na EAE (DEY; SARRAR; GIRI, 2016).

Além disso, o partenolido pode modular a resposta imune por redução da expressão de interleucinas como: IL-6, IL-2 e a IL-1 β ; de TNF- α e de enzimas como a COX-2 e a *iNOS* em órgãos como baço e fígado. Como todos estes fatores estão envolvidos no aumento do processo inflamatório, pode ser esperado que essa inibição resulte em um efeito anti-inflamatório (CARVALHO, 2015).

Em um estudo realizado por Smolinsk e Pestka (2005) foi demonstrado efeito supressor do partenolido sobre a resposta imune em camundongos, utilizando LPS para induzir o processo inflamatório. Foram analisados os perfis de IL-6, TNF- α e IL-1 β presentes no sangue, baço e fígado por ELISA.

Outro estudo, realizado por Zhao e colaboradores (2012), foi utilizado o modelo de colite experimental induzida por Sulfato Sódico de Dextrano em camundongos. Estes foram tratados com o partenolido e foi constatada a melhora do quadro de colite e drástica redução na produção de TNF- α e interleucinas pró-inflamatórias.

Zhang e colaboradores (2017) realizaram experimentos *in vitro* e *in vivo* e, também, obtiveram resultados promissores quanto a atividade anti-inflamatória do partenolido. Foi observada a capacidade dessa molécula de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como: TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-17. Além disso, esse composto diminuiu a ativação de células do subtipo Th1 e Th17 no início do desenvolvimento do modelo animal utilizado, a neurite autoimune experimental.

Visto isso, é notória a importância de se buscar substâncias capazes de melhorar o quadro clínico da EM, principalmente por se tratar de uma doença neurodegenerativa que acomete indivíduos jovens e em idade produtiva. Encontrar um tratamento com um menor custo e menores efeitos adversos em relação aos já disponíveis corroboram para a melhor qualidade de vida dos pacientes.

Dessa maneira, visto as qualificações promissoras do partenolido como molécula imunomoduladora com ação tanto sobre a resposta Th1 quanto sobre a resposta Th17 (ZHANG, 2017), ambas envolvidas na patogênese da EM, o presente trabalho visa avaliar a ação do partenolido como possível imunomodulador no

processo patogênico da Esclerose Múltipla. Para isso, foi utilizado o modelo animal da EAE com a finalidade de estudar as alterações histopatológicas e imunológicas da doença frente ao tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do partenolido sobre os aspectos histopatológicos do SNC, empregando a EAE como modelo de estudo da EM.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos do partenolido sobre um padrão histológico no SNC, utilizando colorações realizadas por Hematoxilina e Eosina;
- Investigar os efeitos do partenolido sobre um padrão histológico no SNC por imunohistoquímica, por meio da determinação de células que expressam *iNOS*, T- bet, GATA-3, IL-17, TGF- β 1 e TGF- β 2;
- Correlacionar os resultados e analisar *in situ* o efeito imunomodulatório do partenolido sobre as respostas Th1, Th2 e Th17 no modelo de esclerose múltipla (EAE).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTO DE INDUÇÃO DA EAE E ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados cortes histológicos provenientes de um estudo anterior, o qual foi previamente aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo protocolo 029/2013 (FONTES, 2013).

Os animais, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), tinham de 8 a 12 semanas de vida. Ao todo foram utilizados 17 animais para o estudo. Estes foram divididos em 4 grupos e eutanasiados no 19° dia após a indução da EAE (pico da doença). Segue abaixo a caracterização da divisão dos grupos.

Grupo I (Controle negativo): camundongos C57Bl/6 sem indução da EAE (n=3);

Grupo II (EAE): camundongos C57Bl/6 com a indução da EAE (n= 5);

Grupo III: camundongos C57Bl/6 com a indução da EAE e tratados com 2,5 mg/Kg/dia de partenolido (n=4);

Grupo IV: camundongos C57Bl/6 com a indução da EAE e tratados com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido (n= 5).

Para indução da doença, todos os animais foram sedados e os dois lados da base da cauda foram raspados a fim de remover os pelos para que fosse realizada a imunização por via subcutânea. Foram utilizados 100 µl de emulsão antigênica. Essa emulsão é constituída por 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) adicionado a 100 µl de PBS estéril (1:1); e por adjuvante de Freund (Sigma), complementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, EUA), na concentração de 4 mg de bactéria por ml de adjuvante.

Ambas as fases da emulsão foram preparadas separadamente, e em seguida, emulsificadas. A fase aquosa da emulsão (MOG₃₅₋₅₅ e PBS) foi agitada em vórtex por dois minutos e adicionada a fase orgânica (adjuvante de Freund e *Mycobacterium tuberculosis*) em banho de gelo. O *Mycobacterium tuberculosis* foi previamente macerado por dois minutos para sua devida ativação.

Após essa etapa, a emulsão foi misturada em seringa, envolvida em papel alumínio e refrigerada por cerca de uma hora para posterior administração no animal. Além disso, no dia da imunização e logo após 48 horas, foram injetados 300 ng de toxina Pertussis (Sigma), por via intraperitoneal, com a finalidade de romper a BHE.

Por fim, após o aparecimento dos sintomas no 13º dia, o partenolido foi administrado por via oral (gavagem, agulha de 20 mm), suspenso em PBS, na dose de 2,5 mg/kg/dia e 5,0 mg/kg/dia até ser atingido o pico da doença, momento o qual os animais foram eutanasiados.

4.2 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após a eutanásia foram retirados cérebro, cerebelo e medula, os quais foram armazenados em soluções fixadoras de formol tamponado a 10% (4 gotas de fosfato de sódio monobásico; 6,5 g de fosfato de sódio difásico; 10 ml de formol P.A e 900 ml de água destilada).

Após a dissecação os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) em banhos de uma hora cada, sendo que foram realizados 3 banhos em álcool absoluto. Posteriormente, o material sofreu processo de clarificação em 3 banhos consecutivos de xilol de uma hora cada. Por fim, foi submetido a impregnação de parafina em estufa a 58° C e a inclusão da parafina à temperatura ambiente. Os cassetes histológicos foram estocados para preparação de lâminas para a coloração histológica e para a técnica de imunohistoquímica. Cada um deles foi cortado em micrótomos modelo "820" Spencer com espessura de 5 µm (CORRÊA; VIEIRA, AARESTRUP, 2010).

Figura 6: Cassetes histológicos contendo os órgãos em parafina



Fonte: do autor

4.3 DESPARAFINIZAÇÃO

O procedimento de desparafinização foi precedido antes de cada coloração. Para isso, foi utilizado o POP estabelecido no CBR/ UFJF:

- 1) Desparafinização em estufa à temperatura de 60°C por 30 minutos;
- 2) Desparafinização em 3 banhos de xilol (xilol I, xilol II, xilol III) por 5 minutos cada;
- 3) Hidratação dos tecidos por meio de banhos em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 3 minutos cada.
- 4) Lavagem em água corrente por 3 minutos;
- 5) Lavagem em água destilada por 1 minuto;
- 6) Montagem das lâminas com lamínula e entellan.

Figura 7: Esquema de desparafinização e hidratação dos cortes histológicos



Fonte: do autor

4.4 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA: HEMATOXILINA E EOSINA

Esse tipo de coloração é utilizada para o estudo de alterações histológicas no tecido pesquisado. Nesse trabalho foi utilizada com a finalidade de avaliar a presença de processos inflamatórios no SNC. Para isso, após o processo de desparafinização, foi realizada a coloração com a Hematoxilina de Harris, que ficou em contato direto com o tecido por 15 minutos. A solução de Hematoxilina de Harris foi preparada da seguinte forma:

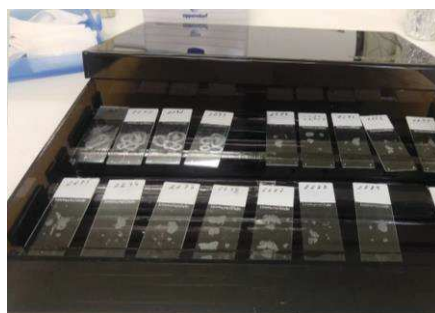
- 1) Uma solução contendo 5 g de hematoxilina, dissolvida em 500 ml de álcool absoluto, foi incorporada a uma solução de 100 g de alúmen de amônio em 1L de água destilada aquecida;
- 2) As soluções misturadas foram levadas à fervura com agitação constante utilizando um bastão de vidro;
- 3) Adicionou-se 2,5 g de óxido de mercúrio lentamente, e a mistura foi mantida em aquecimento até atingir a tonalidade púrpura escura;
- 4) Foi realizado o resfriamento rápido da solução formada em banho de água fria;
- 5) Foi adicionado 2 a 4 ml de ácido acético glacial por 100 ml de solução para melhorar a coloração nuclear;
- 6) A solução foi filtrada e guardada ao abrigo da luz;
- 7) Em um segundo momento foi utilizada a solução de eosina 1% e a diferenciação com etanol a 70%.
- 8) As lâminas coradas foram, então, desidratadas, diafanizadas em xilol e montadas com entellan e lamínula.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes dos tecidos foram feitos com 5 μ m de espessura, e foram colocados em lâminas silanizadas (3- aminopropyltriethoxysilane; Sigma Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA). Primeiramente foram desparafinizadas como descrito no item 4.3 e, em seguida, foi usado o sistema peroxidase/ anti-peroxidase avidina- biotina para essa coloração. Segue abaixo a descrição do procedimento.

- 1) Foi realizada a lavagem das lâminas em água destilada por 2 minutos;
- 2) Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com 3 % de peróxido de oxigênio por duas vezes de 30 minutos em câmara escura;
- 3) A recuperação antigênica foi feita em banho maria á 92 °C em PBS por 40 minutos;
- 4) O material foi resfriado a temperatura ambiente durante 20 minutos;
- 5) Foi realizada uma lavagem com PBS;
- 6) As lâminas foram circuladas, com uma caneta hidrofóbica, de maneira a envolver o material histológico ali presente evitando assim o desperdício dos reagentes;
- 7) Foram adicionadas 4 gotas de Background Sniper, uma solução contendo caseína, utilizada como agente bloqueador, para reduzir ligações inespecíficas.
- 8) Após 15 minutos em câmara úmida foi retirado o excesso com papel toalha.
- 9) Foi feito, em seguida, a incubação com o anticorpo primário (anticorpo policlonal de coelho anti-*i*NOS, anti-T bet, anti-GATA 3, anti-IL-17, anti-TGF- β 1 e anti-TGF- β 2 (Santa Cruz Biotechnology, Brasil), diluídos na concentração de 1:100, por uma hora.

Figura 8: Lâminas incubadas com anticorpo

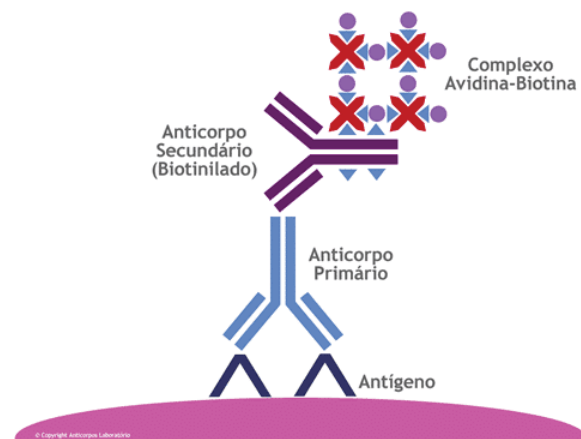


Fonte: do autor

- 10) Após decorrido o tempo necessário, foi feita mais uma lavagem com PBS por submersão durante 2 minutos;
- 11) Foi adicionado 4 gotas do Link Universal Trekkie (anticorpo secundário) por 20 minutos em câmara úmida, e o excesso foi retirado com papel toalha;

- 12) Foi feita mais uma etapa de lavagem com PBS por 2 minutos;
- 13) Foi adicionada 2 a 3 gotas do Trek avidin HPR Label streptavidina por 10 minutos para formação do complexo avidina-streptavidina (Fig. 9);
- 14) Logo após foi efetuada mais uma lavagem com PBS.

Fig. 9: Sequência de reações em imunohistoquímica



Fonte: ANTICORPOS LABORATÓRIO, 2015

- 15) As lâminas foram contracoloradas com hematoxilina de Erlich (4 gotas por 2 minutos e 30 segundos), seguida de duas lavagens de 5 minutos com água destilada;
- 16) Foi feita a etapa de desidratação com álcool, diafanização com xilol e montagem com lamínula e entellan;
- 17) Os cortes foram analisados e contados em microscópio óptico no aumento de 400 vezes e foram separadas 10 fotografias por sessão das áreas do SNC (medula, cérebro e cerebelo) (Zeiss Axiostar, Zeiss, Germany).

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

4.6.1 Avaliação microscópica descritiva e histomorfométrica

Com o objetivo de investigar as alterações histopatológicas da EAE no SNC frente ao tratamento com partenolido, foi avaliada a presença de infiltrados inflamatórios, celularidade glial, organização da bainha de mielina e alterações

vasculares. Os cortes foram observados, inicialmente, no aumento de 200x. Após isso, foram selecionadas áreas anatômicas, representativas de cada órgão (medula espinhal, cérebro e cerebelo), para análise descritiva dos campos e para captura por imagem computadorizada (aumento de 400X) (câmera digital Axion vision C5 acoplada ao microscópio óptico Zeiss).

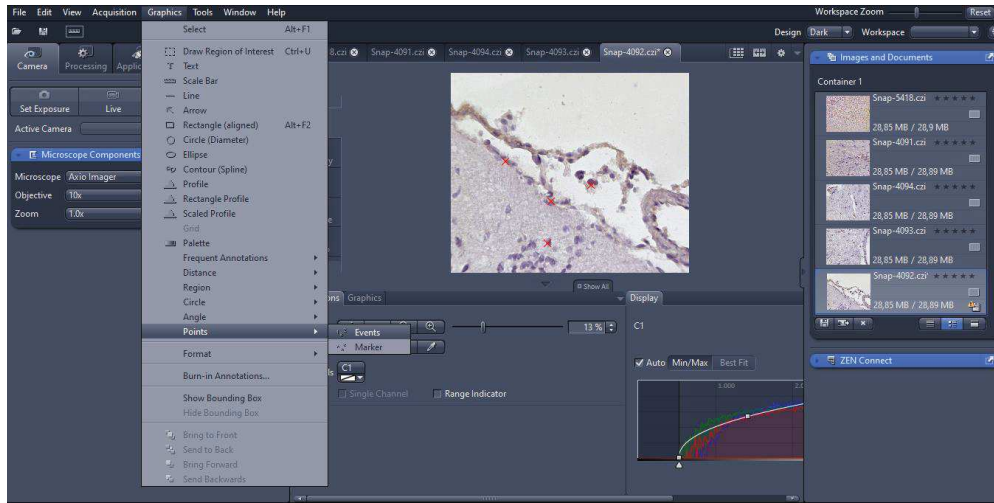
As fotomicrografias digitalizadas foram, em seguida, submetidas a histomorfometria semi-automática (ZEN 2012® Zeiss) para quantificação de células inflamatórias por campo. Os valores são expressos em médias aritméticas simples por grupo de animais.

4.6.2 Avaliação *in situ* da expressão dos anticorpos: anti-iNOS, anti-T bet, anti-GATA3, anti-IL17, anti-TGFβ1 e anti-TGFβ2

Todos os cortes foram observados inicialmente em um aumento de 200 vezes, e fotografados no aumento de 400 vezes, por dois profissionais com formação e experiência em histopatologia. Em seguida, foram selecionadas 4 áreas anatomicamente representativas de cada órgão: cerebelo, cérebro e medula, para a captura digital por sistema computadorizado (câmera digital Axion vision C5 acoplada ao microscópio óptico Zeiss). A imunohistoquímica foi realizada para avaliar a expressão de *iNOS*, T- bet, GATA-3, IL-17, TGF-β1 e TGF-β2. Foram consideradas positivas as células que apresentaram coloração acastanhada.

A quantificação das células positivas foi operada por histomorfometria semi-automática (ZEN 2012® Zeiss) (Figura 10) e o resultados foram expressos em porcentagem de células, no qual a referência foi o número total de células (100%) presente por campo (células positivas e células negativas).

Figura 10: Interface do programa ZenBlue 2012, Zeiss (Alemanha) indicando como é realizada a análise semi-automática das células



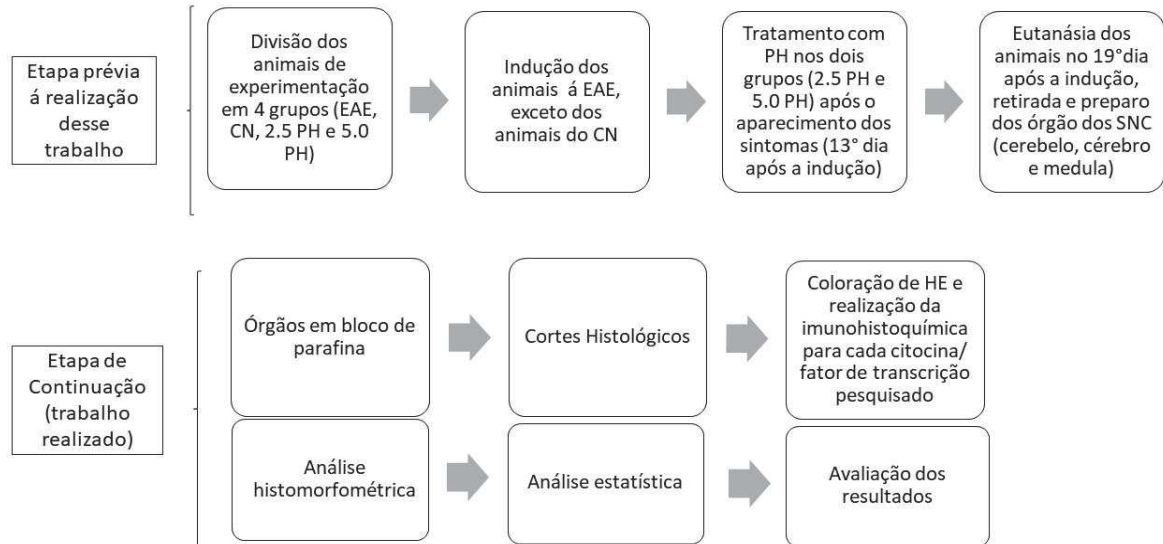
Fonte: do autor

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram feitos testes paramétricos: teste de Kruskal- Wallis seguido por Tukey. A execução foi realizada pelo programa GraphPad (GraphPad inStat software, San Diego, CA).

4.8 RESUMO DAS ATIVIDADES

Segue abaixo um esquema sequencial referente à ordem de execução de cada etapa metodológica desse estudo.

Figura 11: Esquema sequencial do trabalho realizado

Fonte: do autor

5 RESULTADOS

5.1 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA

A observação da figura 12 permite a visualização das características do tecido nervoso dos animais dos grupos: controle negativo, EAE, tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia e tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia. Em relação ao grupo controle negativo, pode-se observar que, tanto no cerebelo (Fig. 12 A) quanto no cérebro (Fig. 12 B) e na medula (Fig. 12 C), não há presença de infiltrado inflamatório, apresentando, assim, características compatíveis com a normalidade.

No grupo EAE nota-se, no cerebelo (Fig. 12 D), a presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso, com aumento da celularidade glial e de células mononucleares, tanto na substância branca quanto na cinzenta, inclusive próximas aos vasos da meninge. Além disso, os feixes de mielina apresentam-se de forma rara e desorganizada.

No cérebro (Fig. 12 E) é observada a presença de infiltrado inflamatório misto e difuso, além de numerosas células mononucleares e neutrófilos nas regiões corticais, com inflamação focal. É notada a presença de grande quantidade de células gliais, inclusive próximas aos vasos da meninge. Os vasos sanguíneos apresentam-se com maior dilatação na substância branca e na substância cinzenta. Ademais, há ausência total de organização da mielina.

Na medula (Fig. 12 F) pode-se observar a presença de infiltrado inflamatório mononuclear misto e difuso, com algumas regiões focais de inflamação. Além de grande celularidade glial e vasodilatação nas substâncias cinzenta e branca, com ausência total de organização da mielina.

O grupo tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia apresenta, no cerebelo (Fig. 12 G), infiltrado inflamatório mononuclear difuso intenso. Além do aumento da celularidade glial total, com células mononucleares aumentadas, também, próximas aos vasos dilatados nas substâncias branca e cinzenta. Os feixes de mielina estão presentes de forma desorganizada e discreta.

No cérebro (Fig. 12 H), é observado o aumento da celularidade glial total, com células mononucleares aumentadas, também, próximas aos vasos dilatados das substâncias branca e cinzenta. Os feixes de mielina apresentam-se de maneira desorganizada e discreta.

Na medula (Fig. 12 I), é constatada a presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso, com aumento na celularidade glial total. Além disso, é notado o aumento de células mononucleares nas substâncias branca e cinzenta, inclusive próximas aos vasos da meninge. Os feixes de mielina apresentam-se de maneira desorganizada e discreta.

Já no grupo tratado com partenolido na dose de 5.0 mg/Kg/dia, no cerebelo (Fig. 12 J), a substância branca apresenta características de remielinização, porém com feixes desorganizados em algumas regiões. Na substância cinzenta, a celularidade encontra-se normal, enquanto que, na substância branca, aumentada, com discretas células mononucleares difusas. Ademais, 2 animais (50%) apresentam características compatíveis com a normalidade, exceto por discreta desorganização da substância branca (bastante mielina, mas desorganizada em algumas áreas).

No cérebro (Fig. 12 K), as regiões corticais apresentam maior celularidade glial na substância branca, com presença de feixes de mielina quase totalmente organizados. É notada a presença de infiltrado inflamatório discreto e difuso mononuclear, com discreta vasodilatação capilar nas substâncias branca e cinzenta.

Na medula (Fig. 12 L), a substância cinzenta apresenta-se com infiltrado inflamatório mononuclear difuso e discreto. Já na substância branca, poucas células esparsas, com pequenas áreas de infiltrado inflamatório focal associado aos vasos da meninge. Em relação a organização da mielina, a mesma apresenta organização “intermediária”.

O gráfico 1 apresenta a quantidade de leucócitos por campo nos grupos: controle negativo, EAE, tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia e tratado com partenolido na dose de 5.0 mg/Kg/dia. Para o grupo controle negativo a quantidade leucócitos por campo é de 6.66 ± 3.09 para o cerebelo, 7 ± 2.59 para o cérebro e 5.27 ± 4.56 para a medula. Para o grupo do EAE os valores são de 181.75 ± 86.84 para o cerebelo, 156.86 ± 28.51 para o cérebro e 184.43 ± 24.65 para a

medula. No grupo tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia, os valores são de 60.81 ± 13.49 para cerebelo, 73.86 ± 28.55 para o cérebro e 57.00 ± 23.07 para a medula. No grupo tratado com partenolido na dose de 5.0 mg/Kg/dia, os valores são de 55.13 ± 28.51 para cerebelo, 91.13 ± 32.24 para o cérebro e 68.88 ± 24.38 para a medula.

Os valores das médias apresentados possuem uma diferença estatística entre os grupos, sendo que, entre o grupo EAE e o grupo do controle negativo a probabilidade de significância dessa diferença é $p < 0.001$. Já os grupos submetidos ao tratamento com partenolido, tanto na dose de 2.5 mg/Kg/dia quanto na dose de 5.0 mg/Kg/dia, apresentam uma probabilidade de significância de $p < 0.001$. Entre as doses não há diferença entre os valores.

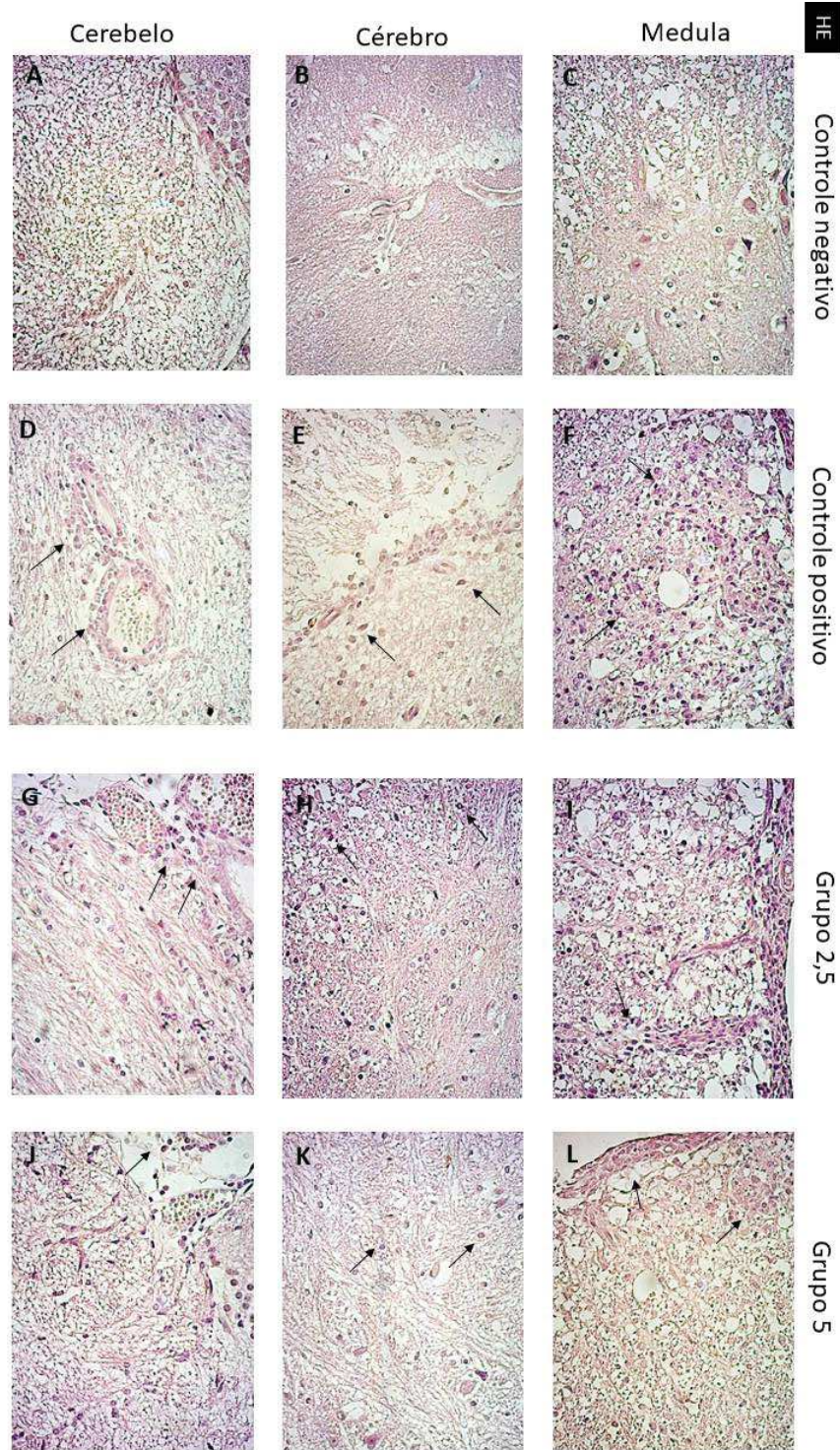


Figura 12: As imagens acima mostram a presença de infiltrado inflamatório através da coloração de hematoxilina e eosina para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula) e separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com a dose de 5,0 mg/Kg/dia de partenolido). Seta pretas indicam leucócitos (Câmera Sony DCR-PC 100 e Software Axiovision release® version 4.8).

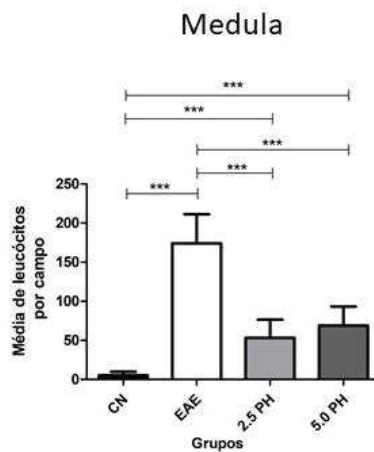
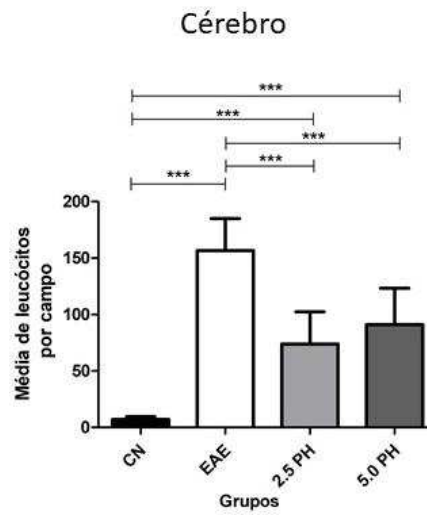
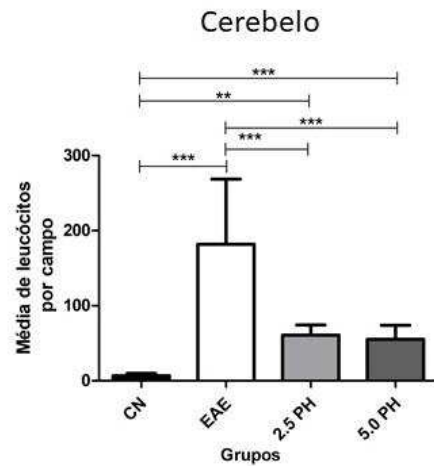


Gráfico 1: Quantificação de leucócitos por campo microscópico (400x) em cortes corados por hematoxilina e eosina, em amostras do SNC: cerebello, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. Resultados expressos em média aritmética simples \pm desvio padrão. ($p < 0.001$). Fonte: do autor

5.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

5.2.1 - Expressão de *iNOS* no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido

A figura 13 permite a visualização das características do tecido nervoso dos animais dos grupos: controle negativo, EAE, tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia e tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia. Além disso, permite um paralelo com os resultados expostos no gráfico 2, por ilustrar os valores da porcentagem média de células inflamatórias que estão expressando *iNOS*. Sendo assim, para o grupo controle negativo os valores de porcentagem média são: 12.19 ± 8.65 para o cerebelo (Fig. 13 A), 4.35 ± 2.75 para cérebro (Fig. 13 B), e 13.12 ± 4.04 para a medula (Fig. 13 C). Para o grupo EAE, os valores são: 55.07 ± 18.63 para o cerebelo (Fig. 13 D), 60.26 ± 15.7 para o cérebro (Fig. 13 E), e 55.96 ± 11.12 para a medula (Fig. 13 F). Para o grupo tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia, os valores são: 34.17 ± 9.25 para o cerebelo (Fig. 13 G), 43.50 ± 9.40 para o cérebro (Fig. 13 H), e 30.06 ± 10.24 para a medula (Fig. 12 I). Já para o grupo tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia, os valores são: 25.60 ± 10.97 para o cerebelo (Fig. 13 J), 39.47 ± 13.51 para o cérebro (Fig. 13 K), e 30.72 ± 16.84 para a medula (Fig. 13 L).

Os valores da média de células expressando *iNOS* diferem estatisticamente entre os grupos, sendo que, entre o grupo controle negativo e o grupo EAE, a probabilidade de significância é $p < 0.001$. Além disso, a média do grupo EAE difere em relação a média dos grupos tratados. Para a dose de 2.5 mg/Kg/dia, a probabilidade de significância de $p < 0.001$ para cerebelo e medula, e $p < 0.01$ para cérebro. Já para a dose de 5.0 mg/Kg/dia, a probabilidade de significância de $p < 0.001$ para cerebelo, cérebro e medula. Entre as doses não há diferença estatística.

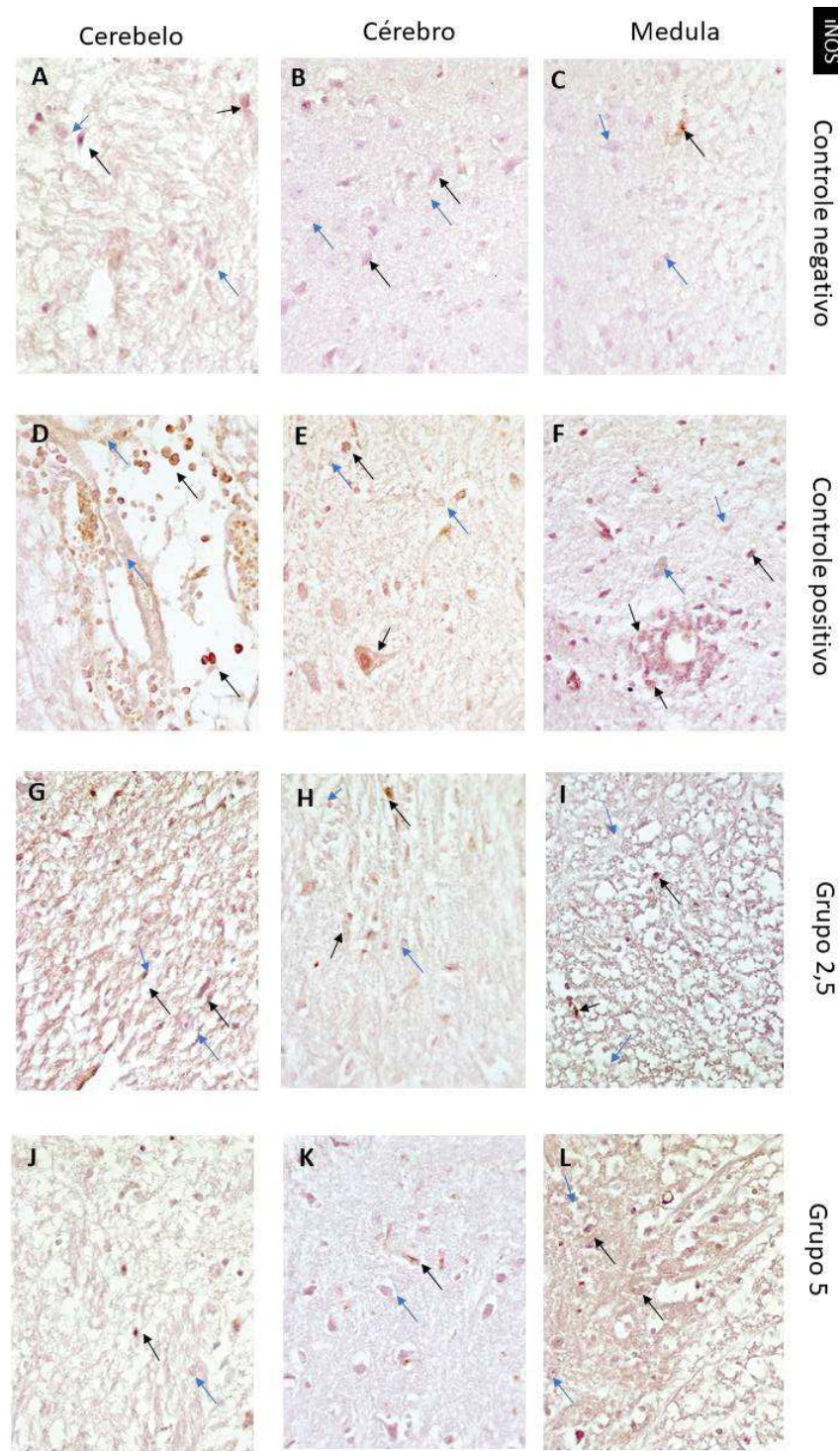


Figura 13: As imagens acima representam a expressão de *iNOS* determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula) e separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido). Seta pretas: células consideradas positivas; setas azuis: células consideradas negativas (Câmera Sony DCR-PC 100 e Software Axiovision release® version 4.8).

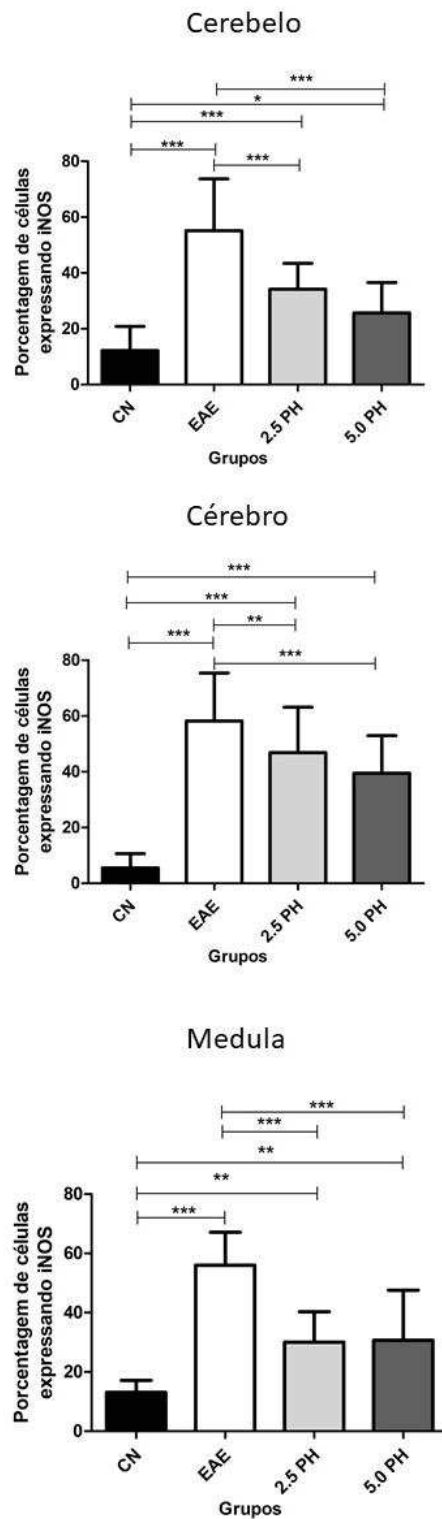


Gráfico 2: Porcentagem de células expressando *iNOS* no cerebello, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Sendo que * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Fonte: do autor

5.2.2 - Expressão de T- bet no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido

A figura 14 permite a visualização das características do tecido nervoso dos animais dos grupos: EAE, tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia e tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia. Além disso, permite um paralelo com os resultados expostos no gráfico 3, por ilustrar os valores da porcentagem média de células inflamatórias que estão expressando T- bet. Sendo assim, para o grupo EAE os valores são: 26.68 ± 12.54 para o cerebelo (Fig. 14 A), 30.43 ± 8.19 para o cérebro (Fig. 14 B), e 26.47 ± 19.14 para a medula (Fig. 14 C). Para o grupo tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia, os valores são: 27.74 ± 9.56 para o cerebelo (Fig. 14 D), 26.64 ± 7.41 para o cérebro (Fig. 14 E), e 26.47 ± 6.71 para a medula (Fig. 14 F). Já para o grupo tratado com partenolido na dose de 5.0 mg/Kg/dia, os valores são: 58.29 ± 23.88 , para o cerebelo (Fig. 14 G), 45.10 ± 15.99 para o cérebro (Fig. 14 H), e 44.74 ± 13.83 para a medula (Fig. 14 I).

Além disso, o gráfico 3 mostra ainda, a diferença estatística na expressão de T- bet entre os grupos. Entre o grupo EAE e o grupo tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia não há essa diferença. No entanto, entre o grupo EAE e o grupo tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia há diferença estatística, sendo que a probabilidade de significância é $p < 0.001$ para cerebelo, cérebro e medula. Além disso, a diferença entre as doses possui um valor de probabilidade de significância de $p < 0.001$ para cerebelo, cérebro e medula.

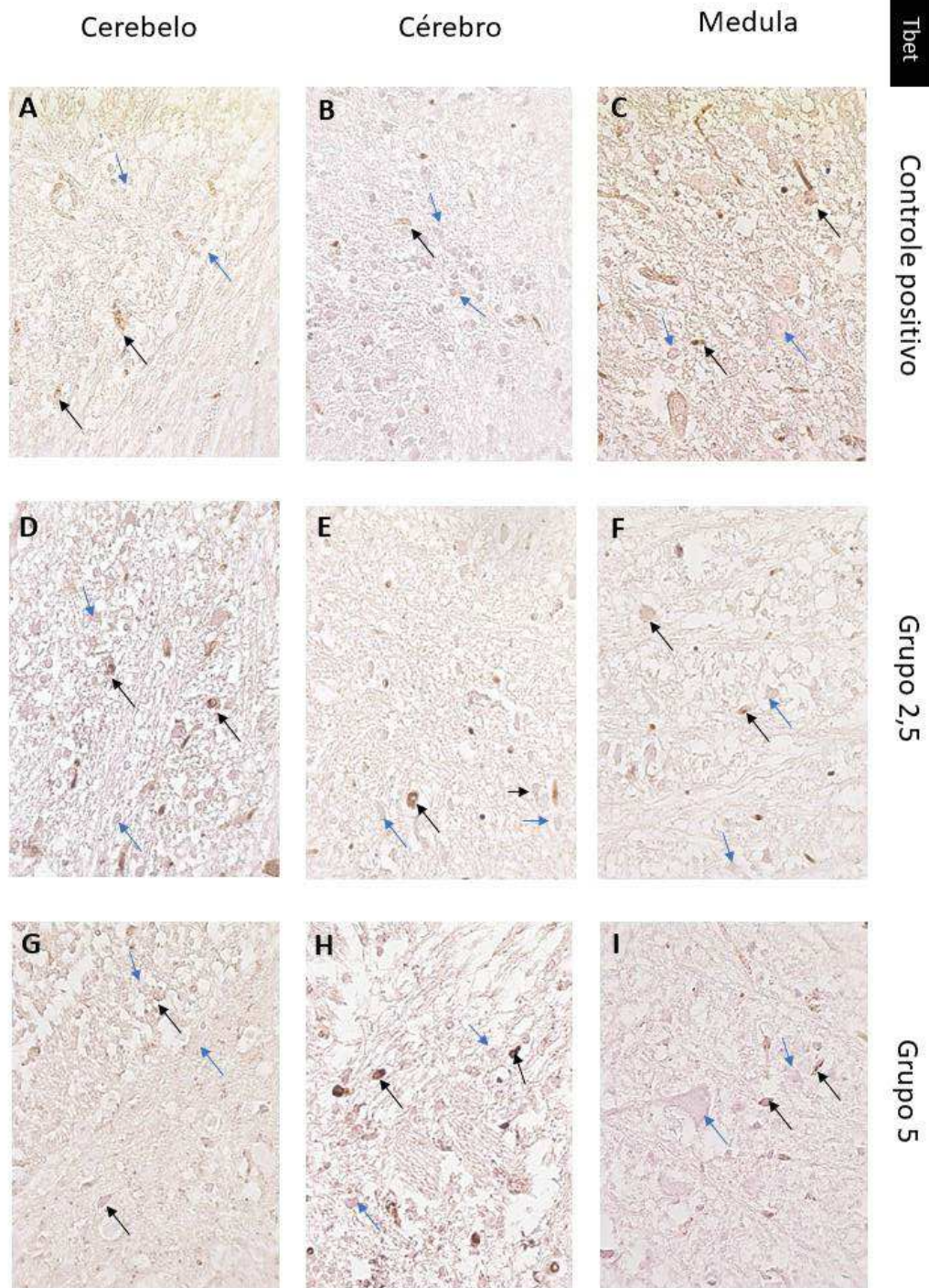


Figura 14: As imagens acima representam a expressão de T- bet determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula) e separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido). Seta pretas: células consideradas positivas; setas azuis: células consideradas negativas (Câmera Sony DCR-PC 100 e Software Axiovision release® version 4.8).

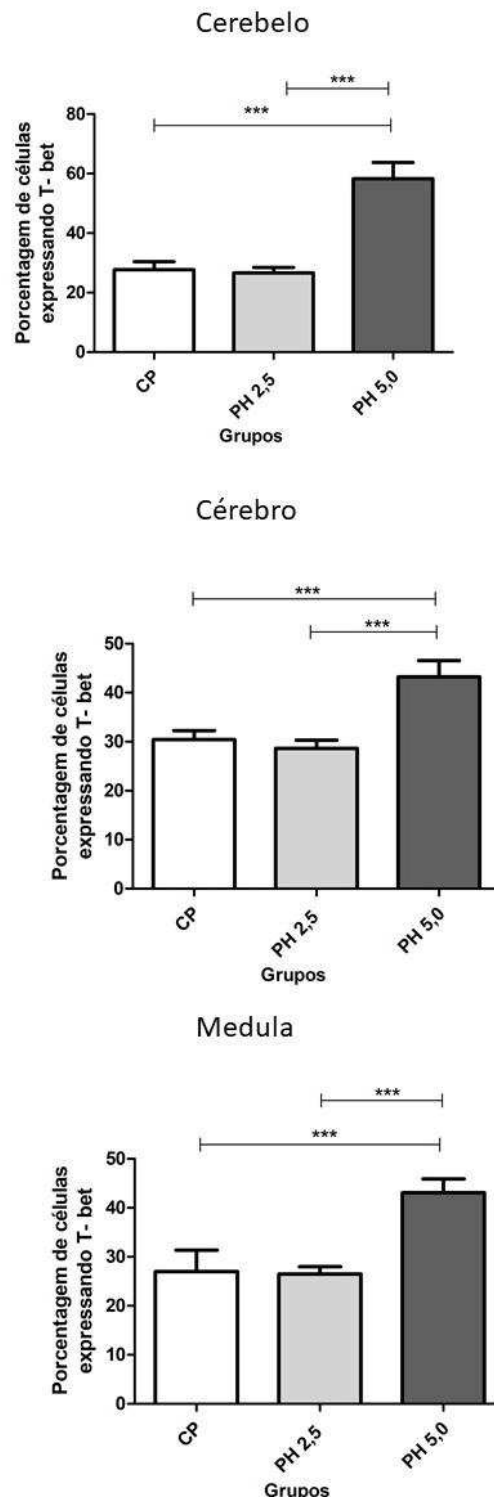


Gráfico 3: Porcentagem de células expressando T-bet no cerebello, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Sendo que * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Fonte: do autor

5.2.3 - Expressão de GATA-3 no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido

A figura 15 permite a visualização das características do tecido nervoso dos animais dos grupos: EAE, tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia e tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia. Além disso, permite um paralelo com os resultados expostos no gráfico 4, por ilustrar os valores da porcentagem média de células inflamatórias que estão expressando GATA-3. Sendo assim, para o grupo EAE os valores são: 21.07 ± 10.74 para o cerebelo (Fig. 15 A), 35.79 ± 11.13 para o cérebro (Fig. 15 B), e 30.34 ± 8.03 para a medula (Fig. 15 C). Para o grupo tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia, os valores são: 38.44 ± 7.95 para o cerebelo (Fig. 15 D), 39.32 ± 16.31 para o cérebro (Fig. 15 E) e 38.27 ± 11.43 para a medula (Fig. 15 F). Já para o grupo tratado com partenolido na dose de 5.0 mg/Kg/dia, os valores são: 31.47 ± 9.89 para o cerebelo (Fig. 15 G), 42.13 ± 9.38 para o cérebro (Fig. 15 H), e 36.42 ± 10.73 para a medula (Fig. 15 I).

Além disso, o gráfico 4 mostra a diferença estatística na expressão de GATA-3 entre os grupos. Sendo que, a média do grupo EAE difere em relação a média dos grupos tratados. Para a dose de 2.5 mg/Kg/dia, a probabilidade de significância de $p < 0.001$ para cerebelo e $p < 0.01$ para medula. Já para a dose de 5.0 mg/Kg/dia, a probabilidade de significância é $p < 0.001$ para cerebelo, enquanto que para cérebro e medula os valores não diferem. Entre as doses há diferença estatística para o cerebelo, com um valor de probabilidade de significância de $p < 0.01$

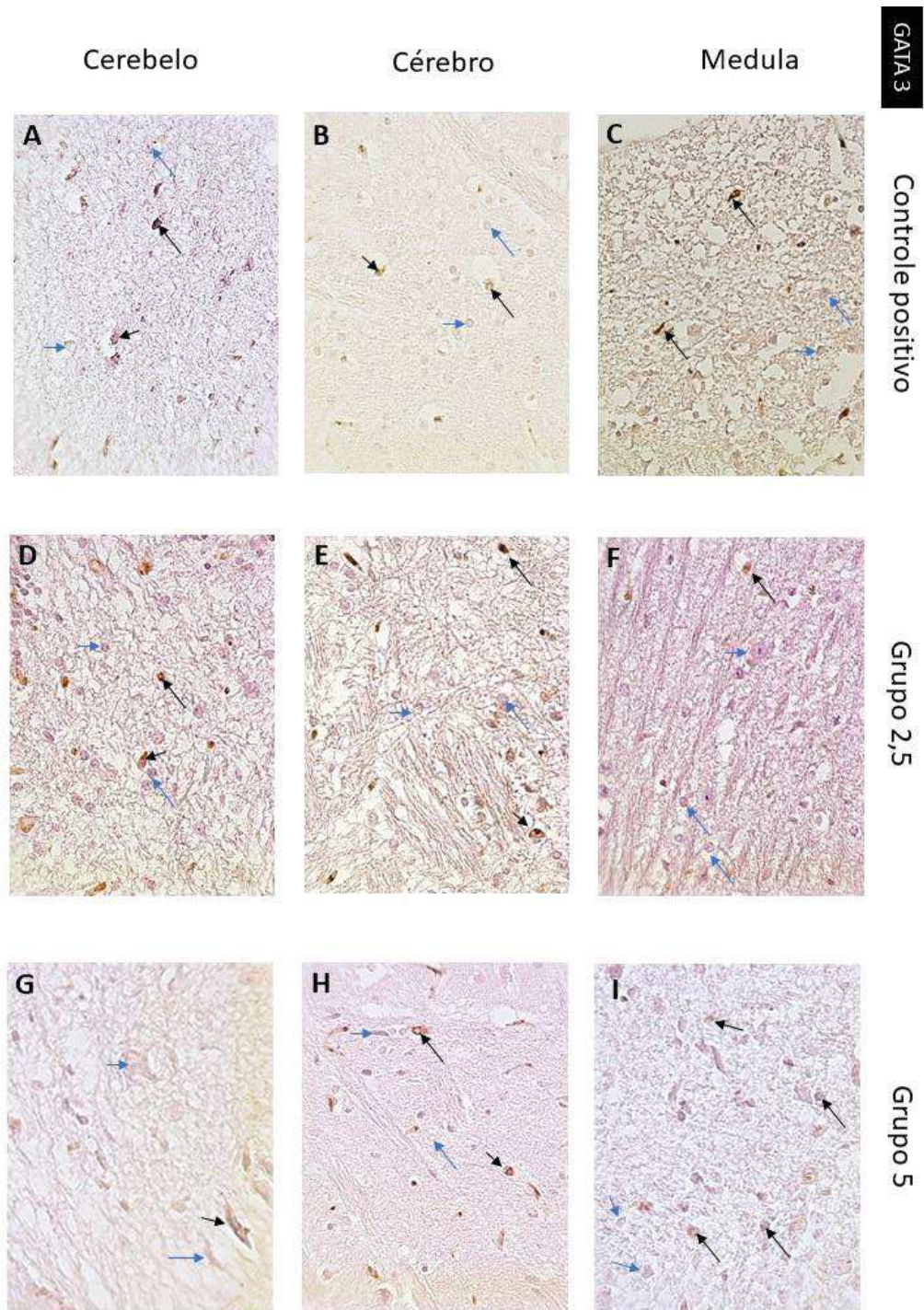


Figura 15: As imagens acima representam a expressão de GATA-3 determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula) e separados por grupos (EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido). Seta pretas: células consideradas positivas; setas azuis: células consideradas negativas (Câmera Sony DCR-PC 100 e Software Axiovision release® version 4.8).

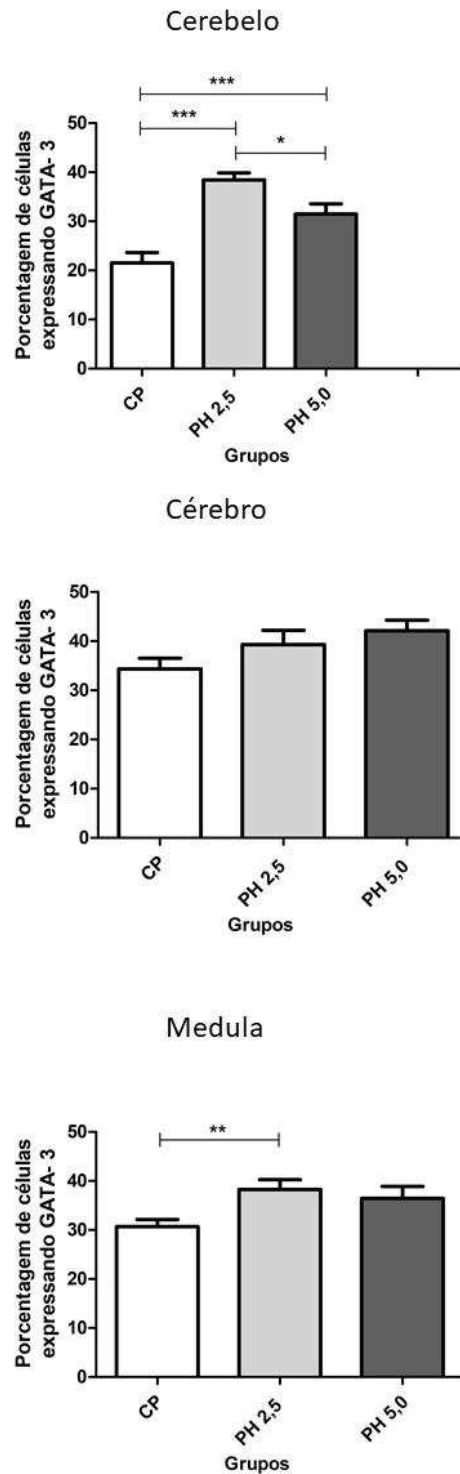


Gráfico 4: Porcentagem de células expressando GATA-3 no cerebello, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Sendo que * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Fonte: do autor

5.2.4 - Expressão de IL-17 no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido

A figura 16 permite a visualização das características do tecido nervoso dos animais dos grupos: controle negativo, EAE, tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia e tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia. Além disso, permite um paralelo com os resultados expostos no gráfico 5, por ilustrar os valores da porcentagem média de células inflamatórias que estão expressando IL-17. Sendo assim, para o grupo controle negativo os valores de porcentagem média são: 4.25 ± 2.12 para o cerebelo (Fig. 16 A), 7.01 ± 2.40 para o cérebro (Fig. 16 B), e 6.49 ± 2.28 para a medula (Fig. 16 C). Para o grupo EAE os valores são: 15.12 ± 4.22 para o cerebelo (Fig. 16 D) 22.35 ± 5.22 para o cérebro (Fig. 16 E), e 25.34 ± 5.59 para a medula (Fig. 16 F). Para o grupo tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia, os valores são: 25.01 ± 8.90 para o cerebelo (Fig. 16 G), 17.93 ± 11.24 para o cérebro (Fig. 16 H), e 17.25 ± 6.23 para a medula (Fig. 16 I). Já para o grupo tratado com partenolido na dose de 5.0 mg/Kg/dia, os valores são: 17.81 ± 12.29 , para o cerebelo (Fig. 16 J), 12.12 ± 3.99 para o cérebro (Fig. 16 K), e 10.2 ± 4.95 para a medula (Fig. 16 L)

O gráfico 5 mostra ainda, a diferença estatística na expressão de IL-17 entre os grupos. Para os grupos controle negativo e EAE, há uma diferença, com uma probabilidade de significância de $p < 0.001$, para o cérebro e medula, e de $p < 0,01$ para o cerebelo. No que tange a diferença entre o grupo EAE e o grupo tratado com partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia, a probabilidade de significância é $p < 0.001$ para a medula. Já entre o EAE e o grupo tratado com partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia, a probabilidade de significância é $p < 0.001$ para cérebro e medula. Entre as doses a probabilidade de significância é $p < 0.01$ para a medula.

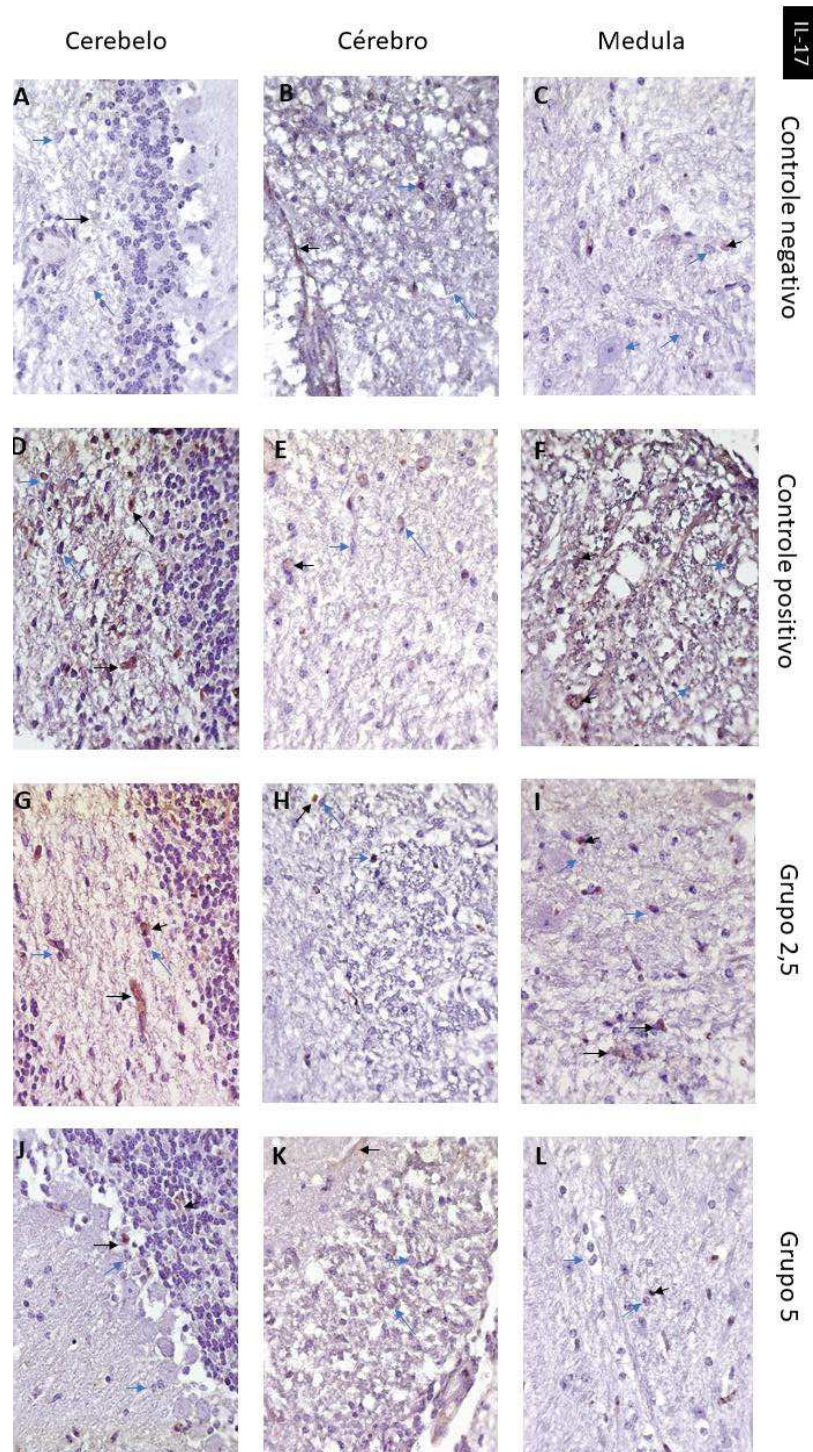


Figura 16: As imagens acima representam a expressão de IL-17 determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula) e separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido). Seta pretas: células consideradas positivas; setas azuis: células consideradas negativas (Câmera Sony DCR-PC 100 e Software Axiovision release® version 4.8).

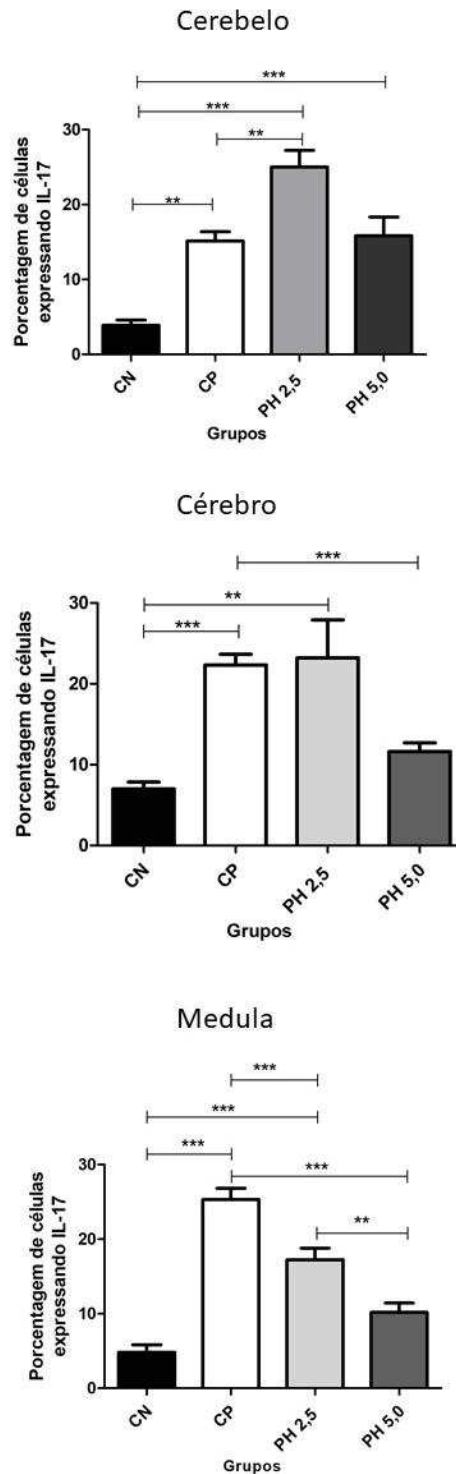


Gráfico 5: Porcentagem de células expressando IL-17 no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Sendo que * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Fonte: do autor

5.2.5 - Expressão de TGF- β 1 no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido

A figura 17 permite a visualização das características do tecido nervoso dos animais dos grupos: controle negativo, EAE, tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia e tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia. Além disso, permite um paralelo com os resultados expostos no gráfico 6, por ilustrar os valores da porcentagem média de células inflamatórias que estão expressando TGF- β 1. Sendo assim, para o grupo controle negativo os valores de porcentagem média são: 60.42 ± 11.05 para o cerebelo (Fig. 17 A), 58.94 ± 8.49 para o cérebro (Fig. 17 B), e 55.57 ± 6.46 para a medula (Fig. 17 C). Para o grupo EAE os valores são: 42.27 ± 6.59 para o cerebelo (Fig. 17 D), 44.73 ± 3.39 para o cérebro (Fig. 17 E), e 47.56 ± 3.82 para a medula (Fig. 17 F). Para o grupo tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia, os valores são: 51.95 ± 10.88 para o cerebelo (Fig. 17 G), 53.56 ± 6.94 para o cérebro (Fig. 17 H), e 48.3 ± 7.19 para a medula (Fig. 17 I). Já para o grupo tratado com partenolido na dose de 5.0 mg/Kg/dia, os valores são: 46.47 ± 4.17 para o cerebelo (Fig. 17 J), 75.12 ± 6.19 para o cérebro (Fig. 17 K), e 59.63 ± 4.76 para a medula (Fig. 17 L).

Além disso, o gráfico 6 mostra a diferença estatística na expressão de TGF- β 1 entre os grupos. Entre o grupo controle negativo e EAE, essa diferença apresenta uma probabilidade de significância de $p < 0.001$ para cerebelo e cérebro, e $p < 0.01$ para medula. Os grupos de animais tratados também diferem em relação EAE. Na dose de 2.5 mg/Kg/dia o valor da probabilidade de significância é $p < 0.05$ para o cerebelo e $p < 0.01$ para o cérebro. Já no grupo tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia o valor é $p < 0.001$ para cérebro e medula. Entre as doses o valor da probabilidade de significância é de $p < 0.001$ para cérebro e medula.

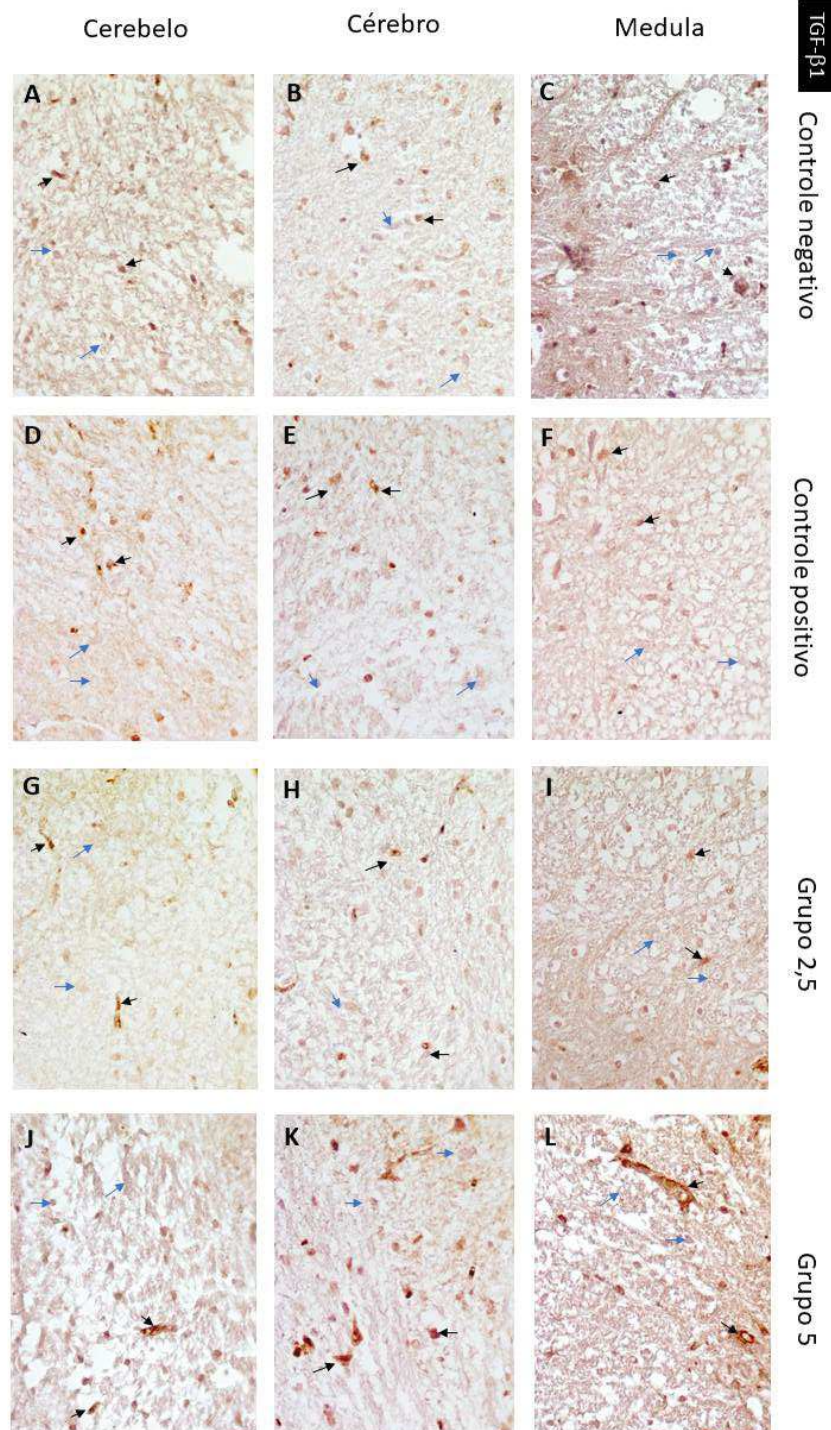


Figura 17: As imagens acima representam a expressão de TGF- β 1 determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula) e separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido). Seta pretas: células consideradas positivas; setas azuis: células consideradas negativas (Câmera Sony DCR-PC 100 e Software Axiovision release® version 4.8).

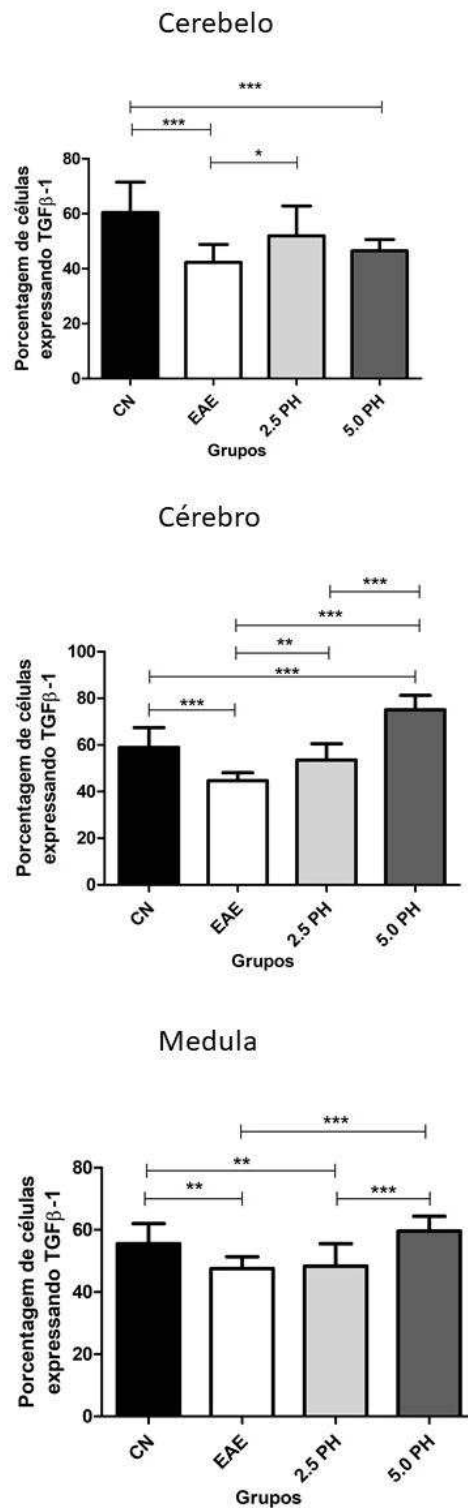


Gráfico 6: Porcentagem de células expressando TGF-β1 no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. Sendo que * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Fonte: do autor

5.2.6 - Expressão de TGF β -2 no SNC de camundongos C57Bl/6 induzidos da EAE e tratados com partenolido

A figura 18 permite a visualização das características do tecido nervoso dos animais dos grupos: controle negativo, EAE, tratado com a dose de 2.5 mg/Kg/dia e tratado com a dose de 5.0 mg/Kg/dia. Além disso, permite um paralelo com os resultados expostos no gráfico 7, por ilustrar os valores da porcentagem média de células inflamatórias que estão expressando TGF- β 2. Sendo assim, para o grupo controle negativo os valores de porcentagem média são: 20.81 \pm 8.00 para o cerebelo (Fig. 18 A), 22.89 \pm 7.88 para o cérebro (Fig. 18 B), e 17.43 \pm 2.00 para a medula (Fig. 18 C). Para o grupo EAE os valores são: 34.91 \pm 7.96 para o cerebelo (Fig. 18 D), 55.58 \pm 8.18 para o cérebro (Fig. 18 E) e 24.79 \pm 8.28 para a medula (Fig. 18 F). Para o grupo tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia, os valores são: 22.66 \pm 5.12 para o cerebelo (Fig. 18 G), 40.23 \pm 5.09 para o cérebro (Fig. 18 H) e 22.31 \pm 5.06 para a medula (Fig. 18 I). Já para o grupo tratado com partenolido na dose de 5.0 mg/Kg/dia, os valores são: 24.13 \pm 4.45 para o cerebelo (Fig. 18 J), 28.60 \pm 13.98 para o cérebro (Fig. 18 K) e 30.34 \pm 12.10 para a medula (Fig. 18 L).

Ainda no gráfico 7 é exibida a diferença estatística na expressão de TGF- β 2 entre os grupos. Entre o grupo EAE e controle negativo há uma diferença com probabilidade de significância de $p < 0.001$ para cerebelo e cérebro. Além disso, pode-se notar que entre o grupo tratado com a dose 2.5 mg/Kg/dia e o grupo EAE, a probabilidade de significância é $p < 0.001$ para cerebelo e cérebro. Já entre o grupo tratado com 5.0 mg/Kg/dia e o grupo EAE, a probabilidade de significância é $p < 0.001$ para cerebelo e cérebro. Entre as doses a probabilidade de significância é $p < 0.01$ para cérebro.

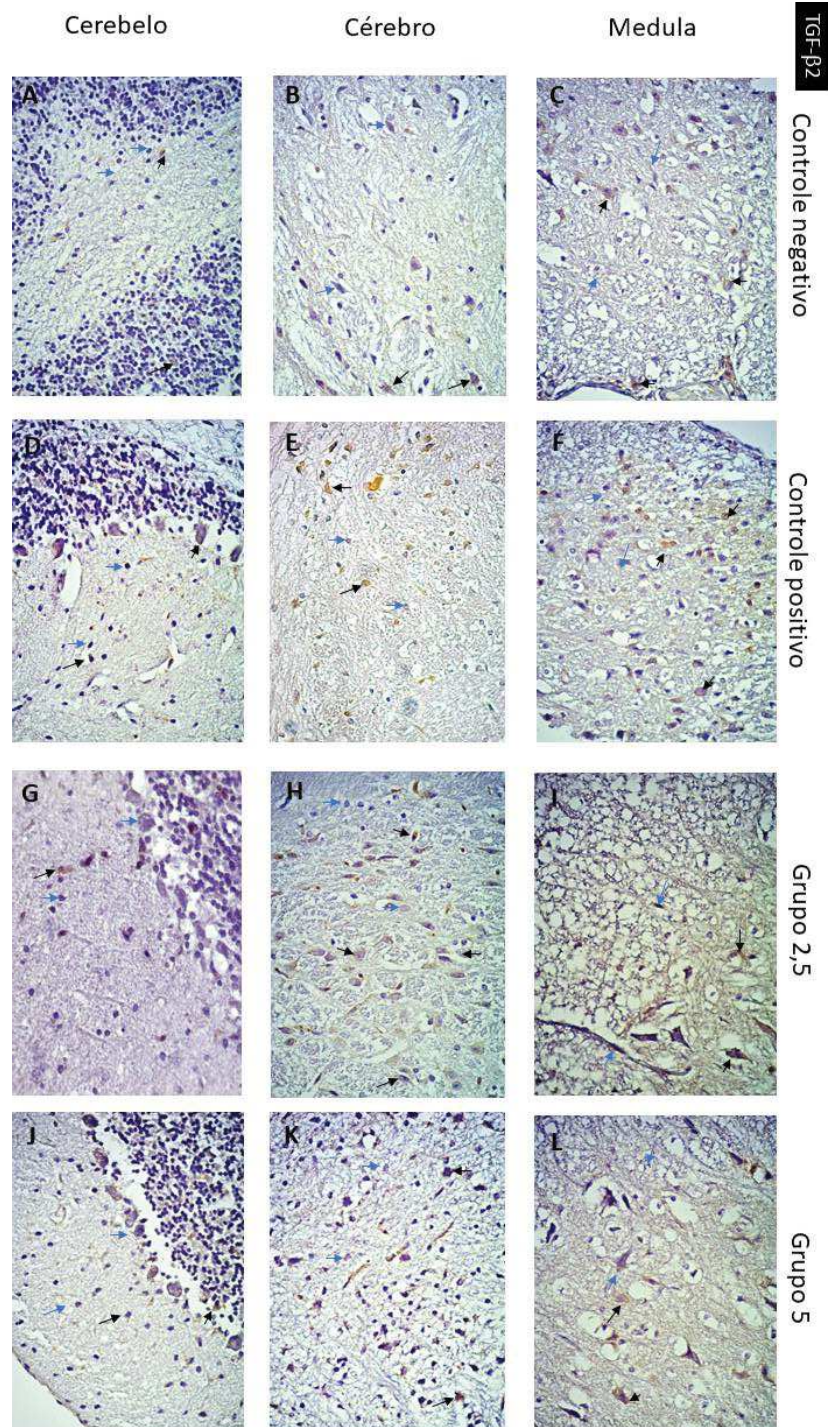


Figura 18: As imagens acima representam a expressão de TGF- β 2 determinada pela técnica de imunohistoquímica para cada órgão do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e medula) e separados por grupos (controle negativo, EAE, grupo tratado com a dose de 2,5 mg/Kg/dia e com 5,0 mg/Kg/dia de partenolido). Seta pretas: células consideradas positivas; setas azuis: células consideradas negativas (Câmera Sony DCR-PC 100 e Software Axiovision release® version 4.8).

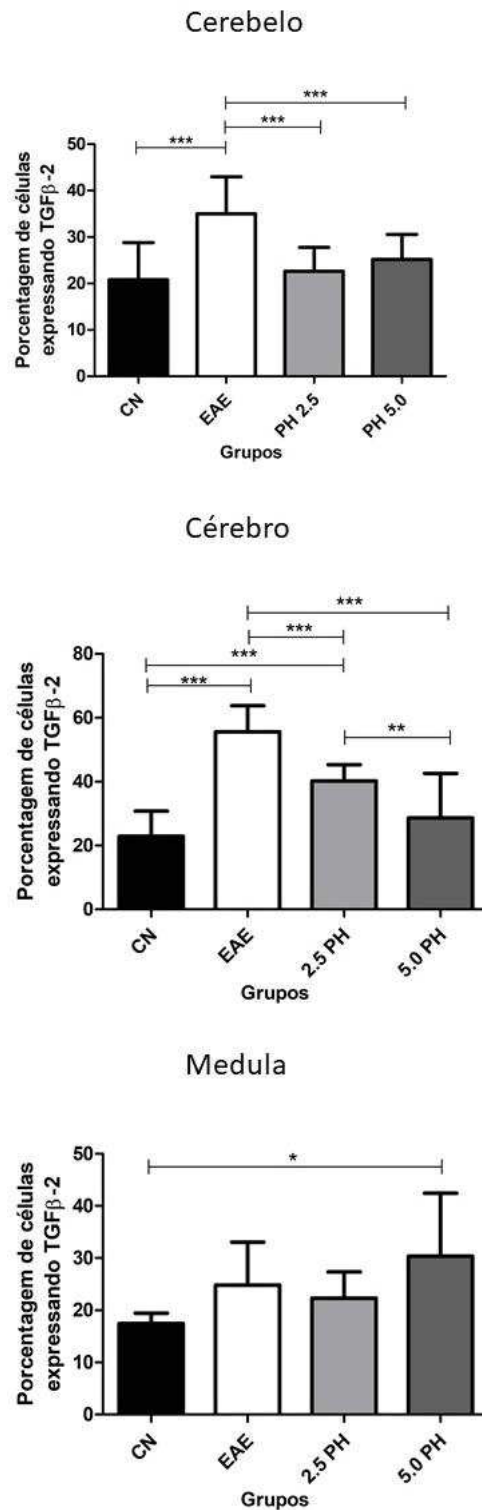


Gráfico 7: Porcentagem de células expressando TGF-β2 no cerebelo, cérebro e medula de camundongos C57Bl/6 induzidos a EAE. CN - controle negativo; EAE; 2.5 PH - partenolido na dose de 2,5 mg/Kg/dia e 5.0 PH - partenolido na dose de 5,0 mg/Kg/dia. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. Sendo que * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Fonte: do autor

6 DISCUSSÃO

A Esclerose Múltipla, como abordado anteriormente, é uma doença de caráter neurodegenerativo, sem cura, que afeta mais de 2 milhões de pessoas ao redor do mundo. A prevalência dessa doença depende de algumas variáveis, dentre elas estão: região, sexo e idade. O fator idade é o responsável por incapacitar muitos jovens, com faixa etária entre 20 e 40 anos, ocasionando sintomas relacionados à déficits motores, sensoriais e cognitivos. Devido a isso, a EM gera um custo social elevado para o atendimento da população acometida com esse distúrbio autoimune. Estima-se um gasto entre 28 a 63 mil euros, para cada paciente, em alguns países europeus (OHLMEIER et. al, 2020).

Devido a essas condições, surge a necessidade de se buscar novos tratamentos, com mecanismos mais eficientes, com menores efeitos colaterais e com menor custo. (MANKINEN et. al, 2020). Para isso, são utilizados modelos experimentais, capazes de induzir, em outras espécies, um padrão fisiopatológico semelhante ao da doença humana (CASTRO et. al 2019).

A EAE é um modelo animal de extrema importância para a pesquisa de novos tratamentos, uma vez que exhibe as principais características da patogênese da EM, incluindo lesões focais de desmielinização, dano axonal e inflamação por sensibilização através de antígenos do SNC que estão presentes na bainha de mielina, como no caso da MOG (MURPHY et. al, 2020).

Segundo os autores Glatigny e Bettelli (2018) a utilização da MOG como agente imunogênico se tornou um importante alvo para a indução da EAE, pois as células T reativas à MOG são mais prontamente detectadas, em pacientes com EM, em relação às células T reativas aos demais agentes antigênicos do SNC. Além disso, a MOG é capaz de gerar a EAE em diversas linhagens de camundongos, bem como C57Bl/6, linhagem utilizada neste estudo, o qual desenvolve um curso clínico crônico da doença.

O modelo animal em questão permite a migração de células do sistema imune através da barreira hematoencefálica, o que torna possível a observação de uma

grande quantidade de células inflamatórias no SNC dos animais com a doença (ZÉPHIR, 2018).

Os resultados obtidos no presente estudo mostra claramente esse aumento de células inflamatórias, expondo (Gráfico 1) um aumento estatístico ($p < 0.001$) das mesmas quando comparado o grupo controle negativo (Fig. 12 A, B e C) frente ao grupo com EAE (Fig. 12 D, E e F).

Essas células inflamatórias caracterizam-se, principalmente, por células mononucleadas, e o aumento no perfil dessas células mostra que o modelo de indução escolhido foi capaz de imunizar os animais, além de gerar uma resposta inflamatória amplificada.

Além do exposto anteriormente, a literatura aponta que no sucesso da indução da EAE, o animal induzido cursa com *score* clínico positivo (GIRALT et. al, 2018), além de alta produção de NO, TNF- α , IFN- γ e IL-17 (HUANG et. al, 2019). Dados não mostrados do nosso grupo de pesquisa estabelece este padrão, com *score* clínico para os animais induzidos ao modelo, de forma compatível com a doença, juntamente com a presença de infiltrado inflamatório e com alta produção de IFN- γ , IL-17, e TNF- α medidos por ELISA (FONTES et. al, 2017).

Nossos resultados também mostraram: o perfil de *iNOS* no SNC dos animais do grupo EAE. Indicando (Gráfico 2) um aumento estatístico ($p < 0.001$) na expressão dessa enzima, quando comparado o grupo controle negativo (Fig. 13 A, B e C) frente aos do grupo EAE (Fig. 13 D, E e F); o perfil de T- bet, que mostra (Gráfico 3) a presença da expressão desse fator no grupo EAE (Fig. 14 A, B e C) uma vez que animais sadios apresentam ausência da resposta Th1 (T-bet); e o perfil de IL-17, mostrando (Gráfico 5) um aumento estatístico ($p < 0.01$, para cerebelo e $p < 0.001$ para cérebro e medula) na expressão dessa citocina quando comparado o grupo controle negativo (Fig. 16 A, B e C) frente ao grupo EAE (Fig. 16 D, E e F).

O estudo realizado por Huang e colaboradores (2019) confirma os resultados encontrados aqui, uma vez que os animais induzidos ao modelo EAE, obtiveram o aumento na expressão de diversos sinalizadores celular, entre eles: *iNOS*, IL-17 e T-bet. Outro estudo, publicado por Comes e colaboradores (2018), também é condizente com os resultados expostos, uma vez que demonstrou, com o uso da MOG como

agente indutor da doença, a ativação de linfócitos TCD4+, bem como, sua diferenciação em subtipos celulares, gerando o aumento na expressão de sinalizadores como IFN- γ , TNF- α e IL-17.

Sendo assim, é possível afirmar que o procedimento experimental realizado com a MOG foi capaz de induzir a EAE na linhagem de camundongos C57Bl/6, por aumentar a quantidade de células inflamatórias no SNC, expressando *iNOS*, T- bet (resposta Th1) e IL-17 em quantidade elevada frente aos animais do controle negativo.

O estudo de Huang e colaboradores (2019) também utilizou a EAE para avaliar a atividade de um produto natural. Foi obtido o extrato da fruta da espécie *Alpinia oxyphylla*, uma planta da medicina tradicional chinesa utilizada para combater dores estomacais e “fortalecer” o cérebro, a fim de avaliar seus efeitos frente ao modelo animal da EM, uma vez que estudos prévios demonstraram efeitos neuroprotetores dessa espécie. Tal estudo obteve resultados promissores ao expor a capacidade deste produto natural em reduzir o processo inflamatório e desmielinizante oriundo da EAE.

Outro estudo, realizado por Safari e colaboradores (2019), utilizou o extrato da espécie *Artemisia dracunculul* L., planta medicinal conhecida por seus efeitos sobre quadros de insônia e dermatite, como tratamento para a EAE. Foram obtidos resultados promissores ao constatar a redução de citocinas inflamatórias como IL-17 e IL-23 por ação deste produto natural.

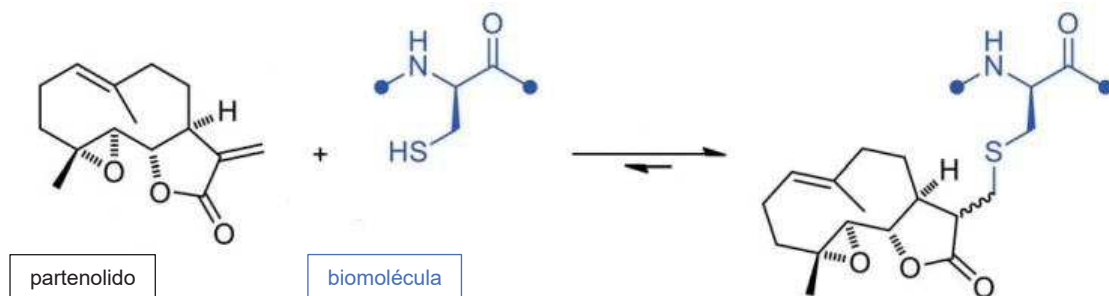
Quando se objetiva o estudo de possíveis tratamentos para doenças autoimunes, como a EM, a atividade anti-inflamatória é a mais visada, uma vez que nesse tipo de doença ocorre uma resposta imunológica contra antígenos próprios do portador. Até o momento foram encontradas diversos alvos celulares e vias bioquímicas influenciados pela atividade de diversos produtos naturais, dentre eles, o partenolido.

Essa substância é responsável por uma série de atividades biológicas, já bem estabelecidas, da planta medicinal da espécie *Tanacetum parthenium*, sendo utilizada para combater febre, enxaqueca, artrite reumatóide, entre outras doenças. Sendo assim, um grande número de estudos já descreveu as atividades biológicas dessa

molécula. Dentre elas, as atividades anti-inflamatória, antioxidante e anticâncer (LIU et. al, 2020).

Isso ocorre, pois essa substância possui grupos funcionais em sua estrutura química, que agem como eletrófilos, doando elétrons para nucleófilos biológicos, como as proteínas, o que permite a interação entre ambos e a atividade biológica da molécula em questão. Essa alta reatividade relacionada a estrutura química permite a interação do partenolido com biomoléculas relacionadas ao processo de inflamação, como a COX-2, o TNF- α e a iNOS (Fig. 18) (Freund et. al, 2020).

Figura 18: Esquema da reação entre o partenolido e as moléculas biológicas



Fonte: Modificada de Freund et. al, 2020

A primeira via relacionada a atividade anti-inflamatória do partenolido foi a via do NF- κ B. Ao agir sobre essa via celular, o partenolido reduz a expressão de genes anti-apoptóticos e a invasão celular. Ademais, muitos sinais e cascatas celulares são afetados pela via do NF- κ B, o que permite dizer que muitos alvos anti-inflamatórios são afetados de forma indireta a partir dessa via (SHEEHAN et. al, 2002).

O estudo publicado por Freund e colaboradores (2020) aponta que essa substância também possui outras atividades como: a modulação de microtúbulos celulares; a modulação de células musculares cardíacas; e a interação com as enzimas tubulina carboxipeptidase (vasohibin 1 e vasohibin 2), que foram recentemente (2017) envolvidas na regeneração de células nervosas, através da inibição da detironização de microtúbulos em neurônios (processo de alteração da estrutura do microtúbulo que o torna rígido e pouco estável).

Sendo assim, a atividade desse composto sobre a regeneração de células nervosas pode estar relacionada com a capacidade dessa substância em promover o

processo de remielinização e de organização dos feixes de mielina como observado no grupo tratado com a dose de 5mg/Kg/dia (Fig. 12 J, K e L).

Outra substância importante em processos inflamatórios é o óxido nítrico (NO), uma molécula lipofílica capaz de regular várias funções fisiológicas. Dentre essas funções estão: neurotransmissão, função vascular e regulação imunológica (XUE et. al, 2018). Para o funcionamento adequado dessas funções é ideal a presença de concentrações mínimas de NO. No entanto, quando as concentrações são elevadas, geram efeitos prejudiciais, como ocorre no caso de paciente com EM, o que resulta em maior gravidade e maior número de recidivas da doença (SONAR; LAL, 2019).

Para que seja produzido o NO é necessária uma enzima denominada óxido nítrico sintase (NOS), responsável por catalisar a oxidação da L-arginina em L-citrulina, liberando assim o NO. Essa enzima possui diferentes isoformas, que variam de acordo com o local de ação, sendo elas: NOS endotelial (*eNOS*), NOS neuronal (*nNOS*) e NOS induzível (*iNOS*) (XUE et. al, 2018).

A enzima óxido nítrico sintase induzível (*iNOS*) é ativada quando existe estímulos inflamatórios, através de vários tipos de células, como: macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais na mucosa intestinal e pulmonar. Além disso, a *iNOS* pode ser ativada por células da micróglia, astrócitos, neurônios do SNC e células endoteliais da BHE (SONAR; LAL, 2019).

Pelo exposto, essa enzima desempenha uma função importante na patogenicidade da EM e da EAE, possuindo um papel crítico na regulação da resposta imunológica, tanto durante a impressão antigênica quanto durante a fase efetora. Sendo assim, a inibição dessa enzima em diferentes estágios do desenvolvimento de doenças autoimunes pode alterar a evolução do processo patológico da mesma (SONAR; LAL, 2019).

Os resultados descritos no item 5.2.1 mostra (Gráfico 2) um grande aumento ($p < 0.001$) na expressão de *iNOS* pelas células inflamatórias, presentes no SNC, quando comparado o grupo EAE (Fig. 13 A, B e C) frente ao grupo controle negativo. (Fig.13 D, E e F). Já os animais tratados com o partenolido, apresentou uma redução significativa ($p < 0.001$) na expressão dessa enzima, o que se deve a redução dos estímulos inflamatórios gerados (Fig.13 G, H, I, J, K e L). Tais resultados sugerem que

a molécula testada pode alterar o curso patogênico da EAE, podendo ser um agente promissor para redução da gravidade e do número de recidivas em pacientes com EM.

No estudo *in vitro* publicado por Carvalho e colaboradores (2016), estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, foi investigada a atividade do partenolido sob a produção de óxido nítrico. O estudo foi realizado com células oriundas de camundongos da linhagem C57Bl/6 induzidos com EAE, utilizando a MOG como agente indutor. Foi demonstrado que a substância em estudo é capaz de reduzir a produção de NO em cultivo celular, detectados pela técnica de ELISA.

Pelo exposto acima, pode-se concluir que o partenolido foi capaz de reduzir a produção de NO através da inibição da enzima *iNOS*, que pode estar presente em diversas células inflamatórias, como os macrófagos, que são responsáveis por causar danos aos componentes do SNC; e, também, pela inibição da atividade dessa enzima por ação de células da micróglia, neurônios e células endoteliais da BHE.

A células da micróglia com fenótipo M1 são as células responsáveis pela grande expressão de *iNOS* no SNC dos C, tratando - se de um importante marcador inflamatório. Sabe-se que a via de sinalização do NF- κ B é a principal via ativa nesse perfil celular (SUI et. al, 2019). Dessa forma, é possível que a redução da expressão de *iNOS* demonstrada neste estudo tenha como mecanismo a inibição da via do NF- κ B em células da micróglia, resultando, também, na redução da produção NO.

O estudo realizado por Wang e colaboradores (2019) demonstra que o partenolido é capaz de inibir a expressão do receptor TLR4, importante para a ativação da via do NF- κ B. Sendo assim, é possível dizer que o partenolido suprime a sinalização desta via, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios e diminuindo, ainda, o estresse oxidativo, por inibir o receptor TLR4.

Outro importante sinalizador inflamatório é o fator de transcrição T- bet, responsável por regular a expressão de vários genes que modulam positivamente a patogênese de diversas doenças autoimunes, dentre elas a EM (KAMALI et. al, 2019). Esse fator de transcrição é capaz de direcionar a resposta T CD4+ para o perfil celular Th1 no SNC, onde é responsável por produzir IFN- γ , levando à ativação de macrófagos e indução do processo de desmielinização (CAI et. al, 2017).

Contudo, estudos mostram que a citocina IFN- γ , pode ser dispensável para a manifestação da EM. Dessa forma, entende-se que há outros tipos de respostas imunes envolvidas no desenvolvimento da doença que, também, podem ser influenciadas pela expressão de T- bet (KAMALI et. al, 2019).

O estudo publicado por Yeh e colaboradores (2011) demonstrou que dentre todos os linfócitos infiltrados no SNC de animais induzidos com EAE, utilizando a MOG, a maior parte (mais de 75 %), era T- bet positiva. Além disso, a expressão primária de T- bet foi realizada por células efectoras Th1, produtoras de INF- γ , embora tenham sido encontradas células produtoras de IL-17, indicando que o subtipo celular Th17 também pode ser capaz de expressar T- bet em menores proporções.

Em um outro estudo, publicado por Basdeo e colaboradores (2016), foi observado que a ativação e a proliferação de células T CD4+ *naive* para o perfil Th1 foi importante para o início do processo patogênico da EM, sendo que a redução da expressão de T- bet no início da manifestação das lesões do SNC, resulta em menor evolução da mesma.

Para que ocorra a diferenciação celular para o subtipo Th1 é preciso todo um processo de sinalização molecular entre as células do sistema imune. Sendo assim, quando há liberação de IL-12 nos linfonodos, ocorre a ativação de STAT4 dos linfócitos *naive*, o que regula positivamente a produção de IFN- γ , capaz de ativar STAT1 e induzir a expressão de T- bet (CAI et. al, 2017).

Os resultados do presente estudo, apresentados no item 5.2.2, entra em acordo com essa informação (Gráfico 3) pois, os animais induzidos ao modelo de EAE apresentaram infiltrado inflamatório com células positivas para T- bet (Figura 13 D, E e F), enquanto que animais sadios não expressam esse fator.

Já em relação aos animais do grupo EAE e tratados com o partenolido, a expressão de T- bet não sofreu redução significativa no SNC (Gráfico 3), indicando que essa substancia não apresentou efeito imunomodulador sobre o principal tipo celular envolvido na expressão desse fator de transcrição, o perfil celular do subtipo Th1.

Outro fator de transcrição envolvido na resposta imune de diversas doenças é GATA-3, responsável pela diferenciação do linfócito TCD4+ *naive* para o perfil celular Th2. Essa diferenciação ocorre quando há uma sinalização por ação da IL-4, que ativa a molécula STAT-6, responsável induzir a expressão de GATA-3. O subtipo celular Th2 irá produzir citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Sabe-se que as respostas Th1 e Th2, por vezes, se antagonizam. Isso ocorre, pois a produção de T-bet (perfil Th1) é inibida pela ativação de STAT-6, e a síntese de GATA-3 é inibida pelo T-bet (ETESAM et. al, 2018).

Dessa forma, quando a resposta Th2 é aumentada, ocorre a redução ou inibição da resposta celular Th1, que é a responsável por causar lesões no SNC. No presente estudo foi demonstrado no item 5.2.3 que o tratamento com partenolido (Fig. 15 D, E e F) aumenta ($p < 0.001$ no cerebelo e $p < 0.01$ na medula, para a menor dose testada) a expressão de GATA-3 em relação ao grupo doente (EAE) (Gráfico 4), o que levaria, por conseguinte, a redução ou não super ativação do perfil celular Th1, gerando menores danos aos tecidos do SNC.

Em um estudo publicado por Yu e colaboradores (2019) foi observado que o aumento da resposta Th2 reduz a gravidade da EM, por diminuir o processo inflamatório mediado por Th1 e por ativar a transcrição de genes envolvidos na ativação de resposta T regulatória. Dessa forma, o perfil celular Th2 está relacionado com a remissão da patogênese da EM.

Um outro estudo, publicado por Haghmorad e colaboradores (2020), demonstrou, a redução de respostas Th1 e Th17 em animais induzidos a EAE tratados com Kombucha. O tratamento permitiu o aumento das respostas dos perfis Th2 e Treg, envolvidos no controle do processo inflamatório. Além disso, os dados sugerem que a terapia com Kombucha pode alterar o equilíbrio entre Th1 / Th2 e entre Th17 / Treg no modelo EAE em favor de Th2 e Treg. Esse balanço favorável entre as respostas citadas está fortemente relacionado à severidade da doença.

As respostas imunes do tipo Th1 e Th2, por muito tempo foram as únicas relacionadas à patologia da EM. No entanto, muitos estudos passaram a correlacionar o desenvolvimento dessa doença com a resposta imunológica do tipo Th17. Esse tipo de diferenciação do linfócito TCD4+ ocorre devido, principalmente, a presença de IL-

6 e TGF- β . Ademais, a proliferação dessas células é mantida pela ação da IL-23 (HAN et. al, 2019).

As células Th17 produzem uma citocina específica, denominada IL-17. Além disso, produz também: IL-6, IL-22, IL-23, TNF- α e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos. Essa diferenciação é controlada a nível molecular pelo fator de transcrição ROR γ T, que é ativado pelo fator de transcrição STAT-3, após sua estimulação ser induzida pelas citocinas IL-6 e IL-21 (DAMASCENO et. al, 2020).

Um estudo, realizado por Fontes e colaboradores (2017), avaliou a atividade de um produto natural, o β -cariofileno, frente a EAE. Foi constatada a redução de citocinas pró-inflamatórias, bem como a redução da resposta celular Th17, associada a melhoria e redução de parâmetros clínicos como *score* e peso corporal. Sendo assim, os autores sugerem que a redução da resposta Th17 melhora o quadro patológico da doença.

Segundo Bravo e colaboradores (2016) a via da resposta celular Th17 é considerada o melhor alvo terapêutico para a EM uma vez que os componentes da via Th1 demonstrou um duplo papel para a patogênese dessa doença. Nossos resultados mostrados no item 5.2.4 demonstraram (Gráfico 5) que o partenolido foi capaz de diminuir a produção de IL-17 no cérebro ($p < 0.001$), na dose de 5.0 mg/Kg/dia, e na medula ($p < 0.001$), em ambas as doses testadas.

O estudo publicado por Carvalho e colaboradores (2017) avaliou a atividade do partenolido, *in vitro*, sobre a expressão de diversas citocinas frente a EAE, utilizando-se de células extraídas de animais induzidos a doença e tratados com a substância. Os resultados demonstraram que o partenolido é capaz de reduzir a expressão de IL-17, TNF- α , IFN- γ , e NO.

Nosso estudo, utilizou, pela primeira vez o partenolido como tratamento, *in vivo*, e a redução na expressão da citocina IL-17 encontrada significa que o tratamento empregado foi capaz de modular a resposta Th17, podendo, assim, reduzir o processo inflamatório gerado por essas células. Pelo exposto, a ação exercida pelo partenolido sobre a resposta Th17 pode ter uma possível explicação na via do fator de transcrição STAT-3.

Wang e colaboradores (2019) também concluíram em seu estudo que o partenolido é capaz de reduzir a produção diversas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, e IL-17, possuindo efeito, também, no controle de edemas cerebrais. Tais estudos confirmam os resultados encontrados em nossos experimentos, uma vez que o tratamento com partenolido culminou na redução de IL-17 no SNC de camundongos induzidos a EAE.

Além do exposto, outro agente sinalizador de resposta imune com papel fundamental em diversas doenças é o fator transformador do crescimento TGF β , uma citocina que está envolvida na diferenciação e na proliferação de células TCD4+. No caso da EM, esse fator é responsável por ocasionar respostas inflamatórias encefalitogênicas (LEE et. al, 2017). No entanto, por se tratar de uma citocina polimórfica, possui, também, um papel importante para a ativação de células T regulatórias (SEVERIN et. al, 2016).

O TGF β apresenta três diferentes isoformas, sendo elas o TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Dependendo do local e da isoforma expressada, podem ocorrer diferentes estímulos para a resposta imunológica. O sistema imune expressa uma grande quantidade da isoforma TGF β -1, que parece ser capaz de limitar a resposta imune, tendo ação sobre a regulação do processo inflamatório. Além disso, foi descrito a influência desse fator sobre a produção de citocinas de células TCD4+ e sobre a inibição da ativação de células TCD8+ (KOĆWIN et. al, 2016). A isoforma TGF- β -1 também está relacionada com a apoptose de células TCD4+ (HASSANZADEH et. al, 2016)

No entanto, o TGF- β 1 também é capaz de aumentar a resposta do tipo Th1. Essa característica mostra que essa citocina apresenta efeito oposto quando age em linfócitos TDC4+ *naive* ou em células efetoras diferenciadas, como a Th1. Quando o TGF β -1 está presente nos gânglios linfáticos, ao agir sobre linfócitos T *naives*, apresenta efeito supressor da resposta imune. Já no local da inflamação, ou seja, no SNC, o TGF- β 1 apresenta efeito pró-inflamatório, estimulando células Th1 (LEE et. al, 2017). Além disso, outro estudo, publicado por LEE e colaboradores mostra que o TGF β -1 é capaz de gerar células Th17 menos encefalitogênicas.

No presente trabalho, os resultados apresentados no item 5.2.5 mostraram uma redução (Gráfico 6) na expressão de TGF β -1 no SNC dos animais induzidos com o modelo de EAE frente aos animais sadios (CN). Já os animais tratados com partenolido, apresentaram um aumento na produção desse fator. Essa informação mostra que a redução da concentração de TGF β -1 no animal doente provoca o aumento do processo inflamatório, enquanto que o tratamento com partenolido aumenta a expressão deste fator, levando a redução do processo inflamatório. Esse resultado mostra uma ação regulatória da resposta imune por pelo TGF β -1 no SNC, fundamentado na redução do infiltrado inflamatório e da menor expressão de *iNOS* e IL-17 pelos animais tratados com o partenolido.

Segundo Severin e colaboradores (2016), pacientes com EM apresentam níveis reduzidos de TGF- β nas sinalizações de linfócitos TCD4+. A expressão desregulada de microRNAs (miRNA), moléculas capazes de alterar a expressão dos genes, pode alterar negativamente a expressão de TGF- β , reduzindo a diferenciação de células TCD4+ *naïves* em células T regulatórias, por reduzir a ativação do fator de transcrição FOXP3. Este estudo mostra que existe cerca de 19 tipos de miRNA capazes de atuar sobre esta via de sinalização, bem como sobre o curso clínico da doença. Pelo exposto, o aumento na expressão de TGF β -1 nos animais tratados com partenolido, demonstrado no presente estudo, permite sugerir que tal condição pode aumentar a expressão de células T regulatórias, através de uma maior expressão do fator transcricional FOXP3.

O estudo publicado por Lalive e colaboradores (2005) mostra que células Th2/3 podem estar envolvidas no processo remielinização do SNC. Esse processo é iniciado pelo recrutamento e diferenciação de células precursoras de oligodendrócito sem lesões desmielinizadas. Os autores demonstram que, ao contrário das citocinas produzidas pelo perfil Th1 (TNF- α e IFN- γ), as citocinas produzidas pelo perfil celular Th2/3, como o TGF- β , induz a micróglia de camundongos C57BL-6 a secretar um fator quimiotático, denominado fator de crescimento de hepatócitos, que atrai células precursoras de oligodendrócitos nas regiões danificadas do SNC.

Além disso, os resultados encontrados por esses autores indicam que todas as isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), são capazes de induzir a secreção

de células precursoras de oligodendrócitos, sendo capazes de reparar danos desmielinizantes do SNC (LALIVE et. al, 2005)

Dessa maneira, a isoforma TGF- β 2 também possui ação imunorreguladora, com capacidade de influenciar células B, T e macrófagos. Segundo Drescher e colaboradores (2002), o TGF- β 2 é capaz de reduzir o processo de desmielinização induzidos por agentes virais, através da redução de infiltrados de macrófagos no SNC. Além disso, também reduz o número de células apoptóticas, mais especificamente na medula. Sendo assim, o controle da desmielinização via ação do TGF- β 2, também pode estar relacionada com a redução da apoptose mediada por macrófagos.

Um outro estudo, publicado por Lee e colaboradores (2017), também relaciona a administração de TGF- β 2 no momento da indução do modelo animal EAE ou durante o desenvolvimento da mesma, com a redução do processo patogênico que envolve a desmielinização de neurônios do SNC.

No presente trabalho, os resultados apresentados no item 5.2.6, mostra (Gráfico 7) que os animais sadios (CN) apresentaram uma menor produção de TGF- β 2, quando comparado ao animal doente (EAE) ($p < 0.001$ para cerebelo e cérebro). Já o animal tratado com partenolido na dose de 2.5 mg/Kg/dia apresentou uma queda na expressão de TGF- β 2 quando comprado grupo EAE ($p < 0.001$).

No entanto, na dose de 5 mg/Kg/dia percebe-se um aumento deste fator, tanto na medula, indicando que nessa dosagem, o partenolido pode começar a ter efeito sobre o processo de remielinização, ressaltando o que descreveu Drescher e colaboradores (2002), sobre o efeito marcante do TGF- β 2 neste tecido. Isso permite supor que uma dose mais elevada, seria capaz de provocar o maior aumento de TGF- β 2 bem como acelerar o processo de remielinização do SNC e reduzir processos apoptóticos. Pode ser observado, ainda, na coloração de HE, realizada no presente estudo, uma maior quantidade e organização das fibras de mielina nos animais tratados nesta dose de 5 mg/Kg/dia (Fig. 11 J, K e L).

Alguns estudos correlacionam o aumento do TGF- β 2, como observado neste estudo, com algumas doenças que apresentam quadros inflamatórios. O estudo realizado por Ganesh e colaboradores (2014) demonstra o aumento da produção de

citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , e também TGF β -2, no plasma de pacientes com displasia fibromuscular, doença vascular não esclerótica que gera a obstrução do fluxo sanguíneo. Outro estudo realizado por Lu e colaboradores (2014), apresenta o aumento na concentração de TGF β -2 no soro e na adenóide de pacientes com síndrome da tosse de vias aéreas superiores.

Diante disso, entende-se que o TGF β -2 pode também atuar de duas formas distintas. Com isso, possui influência tanto no processo inflamatório presente em diversas doenças, quando secretado por certos tipos de células (GANESH et. al, 2014). Contudo, pode atuar especificamente no processo de remielinização e redução de apoptose, quando secretado por células Th2, induzindo a secreção do fator quimiotático capaz de atrair células reparadoras de mielina (LALIVE et. al, 2005).

Através das questões abordadas, sabe-se que a capacidade de uma substância em modular a resposta imune é um importante indício para a busca de possíveis tratamentos para a EM, além disso, permite o melhor entendimento da resposta imune envolvida nessa doença. O modelo animal EAE, por possuir características fisiopatológicas muito semelhantes ao da doença humana, se tornou o modelo mais amplamente aceito para tais estudos. Perante isso, o partenolido se mostrou uma substância capaz de modular a resposta imune na EAE, podendo ser estendido seu estudo para a EM.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho empregou a técnica de coloração de hematoxilina e eosina, bem como a imunohistoquímica, para avaliar o possível efeito imunomodulatório do partenolido frente à EM, utilizando o modelo animal EAE. A análise dos dados obtidos permite concluir que o partenolido foi capaz de reduzir o número de leucócitos presentes no SNC de camundongos induzidos ao modelo animal e tratados com esse produto natural.

Além disso, o partenolido foi capaz de reduzir a expressão de *iNOS*, diminuindo, assim, a produção de NO (dados não mostrados), molécula pró inflamatória e agravadora da patogênese da EAE. O partenolido ainda foi capaz de modular as respostas Th2 e Th17 de forma favorável à redução dos danos causados pela doença através do aumento de GATA-3 e redução da IL-17. No entanto, para a resposta celular do subtipo Th1, essa modulação do processo inflamatório pode ocorrer de forma indireta, via aumento do perfil Th2, uma vez que não houve redução da expressão de T- bet.

Além disso, o partenolido foi capaz de aumentar a expressão de TGF- β 1 nos animais tratados, demonstrando possíveis efeitos protetores relacionados a redução da proliferação de células T efetoras e promoção de células T regulatórias. Por fim, o partenolido foi capaz de induzir um aumento na expressão de TGF- β 2 na medula, quando o animal foi submetido ao tratamento com a maior dosagem.

Dessa forma, os resultados do presente estudo revelam efeitos promissores do partenolido frente a doenças inflamatórias autoimunes, especialmente para a EAE, modelo animal de EM. Sendo necessário estudos futuros em humanos, para avaliar a eficácia e segurança do composto quando utilizado em pacientes com EM.

REFERÊNCIAS

ANGELONI, C., VAUZOUR, D. Natural Products and Neuroprotection. **Int. J. Mol. Sci**, v. 20, p. 5570, 2019

ANTICORPOS LABORATÓRIO. Disponível em:
<<https://www.anticorpos.com.br/metodologias-exames/imuno-histoquimica> >. Acesso em: julho 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. COPAXONE® (acetato de glatirâmer). Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=24329322016&pldAnexo=3980838> Acesso em: junho de 2019

BASDEO et. al. Increased expression of Tbet in CD4+ T cells from clinically isolated syndrome patients at high risk of conversion to clinically definite MS. **SpringerPlus**, v. 5, p. 779, 2016.

BATALHOTE, R. F. P. B. **Estudos da transmissão neuromuscular e do músculo esquelético em um modelo experimental de esclerose múltipla em camundongos**. 2017, 22f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

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

BOLZANI, V.S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, São Paulo, 2016

BORGES, A. S. *et. al.* Dermite Atópica: Os Novos Conhecimentos Sobre a Fisiopatologia da Doença. **Revista SPDV**, Lisboa, v. 75, n. 2, 2017

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta Nº 10, de 02 de abril de 2018. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta Nº 07, de 03 de julho de 2019. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla.

BRAVO et al. Restrained Th17 response and myeloid cell infiltration into the central nervous system by human decidual-derived mesenchymal stem cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, p. 43, 2016

BRODY, Herb *et. al.* Multiple sclerosis. **Nature**, v. 540, n. 7631, dez. 2016

CAI et. al. The Spatio-Temporal Expression Profiles of CD4 + T Cell Differentiation and Function-Related Genes During EAE Pathogenesis. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 195 – 204, fev., 2017

CARVALHO, L. S. A. de. **Avaliação dos efeitos do ácido caurenico e do partenolido sobre a produção de citocinas e óxido nítrico em células de camundongo C57Bl/6 após indução da EAE.** 2015, 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015

CHIQUETI, L. et. al. Esclerose Múltipla, sistema imune e recomendações nutricionais. **Anuário Pesquisa e Extensão UNOESC Videira.** Disponível em <19917-Texto do artigo-65987-1-10-20181127> acesso em:15 ago, 2019

CHUHUTIN, A. et. al. Diffusion Kurtosis Imaging maps neural damage in the EAE model of multiple sclerosis, **Neuroimage**, v. 208, mar., 2020

CHUN, Jerold; HARTUNG, Hans-Peter. Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis. **Clin Neuropharmacol**, v. 33, n. 2, p. 91-101, 2019

CLERICO, M. et. al. Natalizumab in Multiple Sclerosis: Long-Term Management, **Int. J. Mol. Sci.**, v.18, p. 940, 2017

COHAN et. al. Clinical outcomes in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis who switch from natalizumab to delayed-release dimethyl fumarate: A multicenter retrospective observational study (STRATEGY), **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 22, p. 27–34, 2018

COMINI-FROTA, E. R.; VASCONCELOS, C. C. F; MENDES, M. F. Guideline for multiple sclerosis treatment in Brazil: Consensus from the Neuroimmunology Scientific Department of the Brazilian Academy of Neurology. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 75, n. 1, p. 57-65, São Paulo, 2016

DANIKOWSKI, K. M.; JAYARAMAN, S.; PRABHAKAR, B. S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis, **Journal of Neuroinflammation**, v.14, p.117, 2017

DEY, S.; SARKAR, M.; GIRI, B. Anti-inflammatory and Anti-tumor Activities of Parthenolide: An Update, **J Chem Biol Ther**, p.1-2, 2016

DIAS, Alyria Teixeira. **Modulação da Genisteína sobre os receptores Toll Like, e a imunidade adaptativa durante o desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental**. 2016, 120f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016

DRESCHER et. al. TGF- β 2 Reduces Demyelination, Virus Antigen Expression, and Macrophage Recruitment in a Viral Model of Multiple Sclerosis. **J Immunol**, v. 164, p. 3207-3213, 2000

ERRANTE, P. R. et al. Esclerose múltipla: tratamento farmacológico e revisão de literatura. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, ISSN 2318-2083, v. 13, n. 30, São Paulo, fev., 2016

ETESAN et. al. Different Expressions of Specific Transcription Factors of Th1 (T-bet) and Th2 cells (GATA3) by Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Multiple Sclerosis. **Basic and Clinical Neuroscience**, v.9, n.6, p. 458-469, 2018

ASOCIACIÓN DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE GIPUZKOA, Esclerosis multiple: evolución. Disponível em: < https://www.ademgi.org/?page_id=446 > Acesso em: junho 2020

FAYYAZI, E. et. al. Research Paper: Association Between Sunlight Exposure and Vitamin D Intake With Multiple Sclerosis Disability and Progression, **Caspian J Neurol Sci**, v. 4, n. 3, p. 114-120, 2018

FILLIS, M. M. A. et. al. Prevalência de incontinência urinária em participantes da Associação Londrinense de Esclerose Múltipla: estudo transversal. **Revista Hórus**, Londrina, v. 13, n.1, p. 1-13, 2018.

FONTES, Livia Beatriz Almeida. **Avaliação dos efeitos da Licochalcona A e do trans- cariofileno sobre a encefalomielite autoimune experimental (EAE)**. 2013, 128f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013

FONTES, L. B. et al. Immunomodulatory effects of licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Pharm Pharmacol**, v. 66, n 6, p.886-894, 2014

FONTES et. al. β -Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.91, p. 257-264, 2017

FOO, E.C.; RUSSEL, O.; FORD, L.H.L. Mitoxantrone in relapsing-remitting and rapidly progressive multiple sclerosis: Ten-year clinical outcomes post-treatment with mitoxantrone, **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 44, p. 102330, 2020

FREUND et. al. Advances in chemistry and bioactivity of parthenolide, **Natural Product Reports**, 2019

GANESH et. al. Clinical and biochemical profiles suggest fibromuscular dysplasia is a systemic disease with altered TGF- expression and connective tissue features. **The FASEB Journal**, v. 28, p. 3316, 2014

GLATIGNY, S.; BETTELLI, E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS), **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 8, 2018

GLIWINSKI, M.; IWASZKIEWICZ-GRZES, D.; TRZONKOWSKI, P. Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells, **BioDrugs**, v. 31, p. 335-347, 2017

GIRALT et. al. Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) with MOG35–55 in the Mouse, **Myelin: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1791, part of Springer Nature 2018

GOBEL, K. et. al. Cytokine signaling in multiple sclerosis: Lost in translation, **Multiple Sclerosis Journal**, v. 24, n. 4, p. 432-439, 2018

GORIS, An. et. al. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis. **Brain**, Lovaiana, v.138, p. 632-643, 2015

GUERREIRO, K.K. et. al. Análise farmacobotânica de folha e caule de *Tanacetum vulgare* (L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.89-95, 2016

HAGHMORAD et. al. Kombucha ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through activation of Treg and Th2 cells. **Acta Neurologica Belgica**, 2020

HANDEL, A.; IRANI, S. R.; HOLLANDER, G. A., The Role of Thymic Tolerance in CNS Autoimmune Disease, **Nat Rev Neurol**, v. 14, n. 12, p. 723-734, 2018

HASSANZADEH et. al. Leukocyte Gene Expression and Plasma Concentration in Multiple Sclerosis: Alteration of Transforming Growth Factor- β s, Claudin-11, and Matrix Metalloproteinase-2. **Cell Mol Neurobiol**, v.36, n. 6, p. 865-872, 2016

HUANG, Y.; CHEN, Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity, **Am J Transl Res**, v. 8, n. 6, p. 2490-2497, 2016

JADIDI-NIARAGH, F.; MIRSHAFIEY, A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. **Scand J Immunol**. v. 74, n. 1, p. 1-13, 2011.

JUNQUEIRA, S. C. **Inosina previne a resposta inflamatória e nociceptiva induzida pelo modelo experimental de esclerose múltipla**. Dissertação (Mestrado), 103f. Universidade federal de Santa Catarina – Centro de Ciências Biológicas – Pós-graduação em neurociências, Florianópolis, 2015

KAMALI, et. al. A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders, **Molecular Immunology**, v. 105, p. 107–115, 2019

KOĆWIN, et. al. The role of the TGF-SMAD signalling pathway in the etiopathogenesis of severe asthma. **Pneumonol Alergol Pol**, v.84, p. 290–301, 2016

LALIVE et. al. TGF- β -treated microglia induce oligodendrocyte precursor cell chemotaxis through the HGF-c-Met pathway, **Eur. J. Immunol.** v.35, p. 727–737, 2005

LARUSSA, G. T. et al. A influência do sistema endocanabinoide na fisiopatologia da esclerose múltipla. **J Health Sci Inst.**, v. 33, n.3, p. 274-279, 2015

LEE et. al. Analysis of TGF- β 1 and TGF- β 3 as regulators of encephalitogenic Th17 cells: Implications for multiple sclerosis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 46, p. 44 - 49, 2015

LEE et. al. TGF- β regulation of encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 47, p. 446–453, 2017

LIU et. al. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner. **Theranostics**, v. 10, n. 12, p. 5225-5241, 2020

LIU et. al. Analysis of Long Noncoding RNA and mRNA Expression Profiles in IL-9-Activated Astrocytes and EAE Mice, **Cell Physiol Biochem**, v. 45, p. 1986-1998, 2018

LOESHEIDER, J. et. al. Comparative analysis of natalizumab *versus* fingolimod as second-line treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, Basileia, v. 24, n. 6, p. 777-785, 2018

MANKINEN et. al. Cost Assessment Modelling of Treatments for Highly Active Relapsing Multiple Sclerosis, **Adv Ther**, v. 37, p. 800-818, 2020

MAITRO, E. L. et. al. Salix alba (white willow) medicinal plant presents genotoxic effects in human cultured leukocytes, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 82, p.1223-1234, 2020

MARQUES, V. D. et. al. Brazilian Consensus for the Treatment of Multiple Sclerosis: Brazilian Academy of Neurology and Brazilian Committee on Treatment and Research in Multiple Sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 76, n. 8, p. 539-554, 2018

MARRODAN, M. et. al. The role of infections in multiple sclerosis, **Multiple Sclerosis Journal**, v. 25, n 7, p. 891-901, 2019

MIGLIO, G.; VEGLIA, E.; FANTOZZI, R. Fumaric acid esters prevent the NLRP3 inflammasome-mediated and ATP-triggered pyroptosis of differentiated THP-1 cells, **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 215-219, 2015

MONTEIRO, Ana Margarida Duarte. **A Oftalmologia como porta de entrada para o diagnóstico de Esclerose Múltipla – Um Caso Clínico Ilustrativo**. 2016, 41f. Dissertação (Mestrado Integrado a Medicina) – Universidade de Lisboa, 2016

MORAES, Adriel dos Santos. **Estudos de moléculas regulatórias na esclerose múltipla e na encefalomielite autoimune experimental**. 2017, 88f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, 2017

MURPHY et. al. Synaptic alterations and immune response are sexually dimorphic in a nonpertussis toxin model of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Experimental Neurology*, v. 323, p. 113061, 2020

NEVES, F. da. S. Qualidade de vida da pessoa com esclerose múltipla e dos seus cuidadores. **Revista de Enfermagem Referência**, Coimbra, v. 4, n. 12, p. 85-96 2017

NIEROP, G. P. V. et. al. Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients, **Acta Neuropathol**, v.134, p.383-401, 2017

OLIVEIRA, Iara Barreto Neves. **Avaliação de citocinas no sangue periférico e expressão gênica em pacientes com esclerose múltipla tratados com Interferon-beta**. 2017, 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Goiás, 2017

OLSSON, T.; BARCELLOS, L. F.; ALFREDSSON, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis, **Neurology**, v. 13, n. 1, p. 25-36, 2017

OHLMEIER et. al. Epidemiology, characteristics and treatment of patients with relapsing remitting multiple sclerosis and incidence of high disease activity: Real world evidence based on German claims data, **PLOS ONE**, v. 15, n.5, e0231846, 2020

OSÓRIO, J. C. C., GARSÍA, A. M. G. Antiparasitic phytotherapy perspectives, scope and current development. **Infectio**, Colombia, v. 23, n. 2, p.189-204, 2019

PIMENTEL, P. P., TOLDRÁ, R. C. Desenvolvimento de manual para orientações básicas do dia a dia para pessoas com esclerose. **Cad. Ter. Ocup. UFSCar**, São Carlos, v. 25, n. 1, p. 67-74, 2017

POPIOLEK-BARKZYK, K. et. al. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. **Neural Plast.** **Neural Plast.**, Poland, v.2015, p.676473, 2015

SABATINO, J. J. et. al. Anti-CD20 therapy depletes activated myelin-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis, v. 116, n. 51, p. 25800-25807, 2019

SACRAMENTO, T. de O. et. al. Associação entre esclerose múltipla e alelos HLA-DRB1 em uma população miscigenada de Salvador, Ba, Brasil. **Méd. Biol.**, Salvador, v. 17, n. 1, p. 9-15, jan./abr. 2018

SAFARI et. al. Artemisia dracuncululus L. modulates the immune system in a multiple sclerosis mouse model, **Nutritional Neuroscience**, v. 31; 1 - 7, 2019

SEVERIN et. al. MicroRNAs targeting TGF β signalling underlie the regulatory T cell defect in multiple sclerosis, **BRAIN**, v. 139, p. 1747 - 1761, 2016

SHEEHAN et. al. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. **Mol Pharmacol**, v. 61, n. 5, p. 953 - 63, 2002

SALEHI, M. et. al. Th1, Th2 and Th17 Cytokine Profile in Patients with Multiple Sclerosis Following Treatment with Rapamycin, **Iran.J.Immunol.**, v.13, n.2, p. 141 – 7, 2016

SANTOS, N. B. dos. **Participação dos glicocorticoides na progressão e no prejuízo cognitivo da encefalomielite autoimune experimental em camundongos C57Bl/6**. 2017. 29f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2017

SCHEPETKIN, I. A. et. al. The Natural Sesquiterpene Lactones Arglabin, Grosheimin, Agracin, Parthenolide, and Estafiatin Inhibit T Cell Receptor (TCR) Activation. **Phytochemistry**, v. 146, p. 36 - 46, fev. 2018

SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application, **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. 263, 2018

SILVERIO, M. R. S. **Estudo do metabolismo *in vitro* do Partenolídeo**. 2016, 26f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016

SINTZEL, M. B.; RAMETTA, M.; REDER, A. T. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review, **Neurol. Ther.**, v.7, p. 59 - 85, 2018

SIQUEIRA, M. K.; PIRES, L. Processo epigenéticos envolvidos na fisiopatologia da esclerose múltipla com ênfase na função dos miRNAs. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 125 - 136, jul./dez. 2016

SONAR, S. A.; LAL, G. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Front. Immunol.**, v.10, p. 710, 2019

SONG, T. et. al. Glucocorticoid receptor mutations and clinical sensitivity to glucocorticoid in Chinese multiple sclerosis patients, **Neurological Sciences**, v.41, p. 2767 - 2771, 2020

TERRY, Rachael L.; IFERGAN, Igal; MILLER, A. S. D. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. **Methods Mol Bio.**, v. 1340, p. 145 - 160, jan./2016

TORKILDSEN, Ø, MYHR, K. M., BØ, L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis – a review of approved medications, *European Journal of Neurology* , v.23 (Suppl.1), p.18 - 27, 2015

VOSKUHL, R.; MOMTAZEE, C. Pregnancy: Effect on Multiple Sclerosis, Treatment Considerations, and Breastfeeding, **Neurotherapeutics** v.14, p. 974 - 984, 2017

XIÃO et. al. Neural Stem Cell-based Regenerative Approaches for the Treatment of Multiple Sclerosis, **Mol Neurobiol**, v. 55, n 4, p. 3152 - 3171, 2018

XUE et. al. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. 3805, 2018

YEH et. al. Autoreactive Tbet-positive CD4 T Cells Develop Independent of Classic Th1 Cytokine Signaling during EAE. **J Immunol.**, v. 187, n. 10, p. 4998 - 5006, 2011

YSRRAELIT, M. C.; CORREALE, J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development, **Immunology**, v.156, p. 9 - 22, 2018

YU, S.; LIU, M.; HU, K. Natural products: potential therapeutic agents in multiple sclerosis, **International Immunopharmacology**, v. 67, p. 87 - 97, 2019

WALLIN et. al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990 - 2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, **Lancet Neurol**, v. 18, p. 269 - 85, 2019

WANG et. al. Parthenolide ameliorates intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats, **Phytotherapy Research.**, v. 34, n.1, p.1 - 8, 2019

ZÉPHIR, H. Progress in understanding the pathophysiology of multiple sclerosis, *Revue neurologique*, v. 174, p. 358 - 363, 2018

ZHAO, X. et. al. Simultaneous determination of six isoflavonoids in rat plasma after administration of 214 total flavonoid from Gegen by ultra-HPLC-MS/MS. **J Sep Sci**, v.35, n.8, p.984 - 93, 2012

ZHANG, Min et. al. Parthenolide inhibits the initiation of experimental autoimmune neuritis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 305, p. 154 - 161, fev. 2017

ZHANG, Q. et. al. Enantioselective synthesis of cis-hydrobenzofurans bearing all-carbon quaternary stereocenters and application to total synthesis of (-)-morphine, *Nature Communications*, v. 10, p. 2507, 2019