

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
DOUTORADO EM SAÚDE

LÍVIA BEATRIZ ALMEIDA FONTES

“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO SOBRE A  
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE) EM CAMUNDONGOS  
C57BL/6”

JUIZ DE FORA  
2019

LÍVIA BEATRIZ ALMEIDA FONTES

“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO SOBRE A  
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE) EM CAMUNDONGOS  
C57BL/6”

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em  
saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF,  
como parte dos requisitos necessários à obtenção do  
título de Doutor em Saúde. Área de concentração: Saúde  
Brasileira

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup

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

JUIZ DE FORA

2019

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

Almeida Fontes, Livia Beatriz.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO SOBRE A ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE) EM CAMUNDONGOS C57BL/6 / Livia Beatriz Almeida Fontes. -- 2019. 92 f.

Orientadora: Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Coorientador: José Otávio do Amaral Corrêa

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2019.

1. Esclerose múltipla. 2. Encefalomielite autoimune experimental.. 3. Ácido caurenoico.. I. Julião Vieira Aarestrup, Beatriz , orient. II. do Amaral Corrêa, José Otávio, coorient. III. Título.

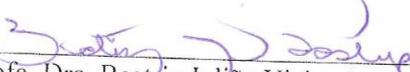
LÍVIA BEATRIZ ALMEIDA FONTES

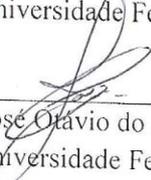
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO SOBRE A  
ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE) EM  
CAMUNDONGOS C57BL/6

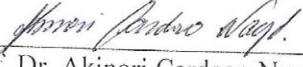
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde - Área de Concentração: Saúde Brasileira.

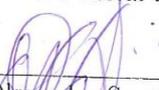
Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

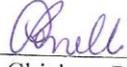
BANCA EXAMINADORA

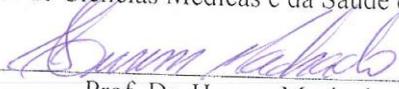
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup – Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Olávio do Amaral Corrêa - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Akinori Cardozo Nagato  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Chislene Pereira Vanelli  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hussen Machado  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho aos meus pais que me ensinaram que sem educação e disciplina não se chega em lugar algum. Ao meu marido Ademar, meu maior incentivador e à minha amada filha Helena que transborda minha vida de amor e que me fez conhecer o real sentido da vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por todas as bênçãos concedidas ao longo da vida, por estender suas mãos nos momentos de desânimo e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

Aos meus pais que, por muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus, agradecer por todo amor incondicional, carinho e preocupação que têm comigo até hoje, e aos meus irmãos pelo estímulo, companheirismo e carinho.

Ao meu Marido Ademar por sempre me incentivar a fazer o meu melhor em tudo que faço, por não ter me deixado desistir e ser parte fundamental dessa conquista.

À Dra. Beatriz Julião Aarestrup por ter aceitado ser minha orientadora, por todos os ensinamentos transmitidos, paciência e ajuda, especialmente nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. José Otávio do Amaral Corrêa, pelos os ensinamentos transmitidos desde o Mestrado, pela atenção e ajuda indispensáveis à realização deste trabalho.

Agradeço também ao Dr. Fernando Monteiro Aarestrup e a todos do Núcleo de Imunopatologia e Imunologia aplicada pela ajuda na realização deste trabalho e aos membros da banca de qualificação que acrescentaram de maneira imprescindível mais conhecimento a este trabalho.

Agradeço a Laetitia, essencial para o desenvolvimento e execução dos experimentos laboratoriais, por toda ajuda.

Ao laboratório NIPPAN, pela ajuda e colaboração.

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

Agradeço à UFJF, à FAPEMIG pela bolsa de estudos e à CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

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

## RESUMO

**Introdução:** A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, crônica, progressiva, inflamatória e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). A encefalomielite experimental autoimune (EAE) é o modelo mais aceito para o estudo da EM. O ácido caurenóico (KA) é um diterpeno natural que possui propriedades anti-inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos *in vivo* do KA em camundongos C57BL/6 induzidos com EAE. **Métodos:** A EAE foi induzida em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com MOG<sub>35-55</sub> e os animais foram tratados oralmente com KA (50 ou 100 mg/kg/dia) a partir do 13º dia até o pico dos sintomas clínicos da EAE. Foi realizada a avaliação do curso clínico da EAE no animais e a avaliação dos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  e NO foi realizada em sobrenadante de cultura de esplenócitos obtida de camundongos tratados. Ainda, foi realizada a análise histopatológica por hematoxilina e eosina e por hematoxilina férrica de Weigert–Pal–Russel, bem como imunistoquímica para IL-17, seguida de histomorfometria, em cortes do SNC. **Resultados:** Foi observado que o KA (50 e 100 mg/kg/dia. *v.o.*) é capaz de melhorar os sintomas clínicos e reduzir significativamente os níveis de citocinas e NO nos animais. Além disso, KA (50 e 100 mg/kg/dia) causou redução na desmielinização, bem como no número de células inflamatórias e na expressão de IL-17 em amostras teciduais do SNC. **Conclusão:** O tratamento oral com KA atenua os danos neurológicos e reduz o infiltrado inflamatório e a desmielinização no SNC em camundongos C57BL/6 com EAE.

**Palavras-chave:** Ácido caurenóico, esclerose múltipla; Encefalomielite experimental autoimune.

## ABSTRACT

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most exploited model for studying multiple sclerosis (MS). Kaurenoic acid (KA) is a natural diterpene that exhibits anti-inflammatory properties. The aim of this work was to investigate the *in vivo* KA effects on C57BL/6 mice induced with EAE. **Methods:** EAE was induced in female C57BL/6 mice with MOG<sub>35-55</sub> and animals orally treated with KA (50 or 100 mg/kg/day) from day 20<sup>th</sup> until the peak of the clinical symptoms of EAE. The clinical course was evaluated in mice and the evaluation of the levels of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ , and NO was performed in culture of splenocytes. In addition, CNS sections were stained by hematoxylin and eosin, the Weigert-Pal-Russel staining, as well as IL-17 immunohistochemical methods, followed by histomorphometry of CNS sections. **Results:** It was observed that KA (50 and 100 mg/kg/day) caused improvement of the clinical symptoms and significant reduction in the levels of cytokines and NO in the animals. In addition, KA (50 and 100 mg/kg/day) reduced demyelination, as well as the number of the inflammatory cells and the expression of IL-17. **Conclusion:** The oral treatment with KA attenuates neurological damages and reduces both inflammatory cell infiltration and demyelination into the CNS of C57BL/6 EAE-mice.

**Keywords:** Kaurenoic acid; multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cortes histológicos da substância branca (A), com axônios mielinizados e substância cinzenta (B) do sistema nervoso central, sendo o pericário (ou corpo celular) evidenciado pelas setas e cabeça de setas.....	23
Figura 2	Estrutura química do ácido caurenico (KA).....	34
Figura 3	Representação da interface do programa Zen 2012® Zeiss, demonstrando a histomorfometria semi-automática em corte do SNC para quantificação da mielina.....	47
Figura 4	Representação da interface do programa Zen 2012® Zeiss, demonstrando a histomorfometria semi-automática das células positivas para expressão de IL-17 (eventos marcados em amarelo). Os eventos marcados em vermelho foram considerados negativos e utilizados para obtenção da porcentagem de células por campo.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Modelos de EAE ativa comumente utilizados e suas aplicações.....	26
Tabela 2	Escore clínico dos camundongos C57BL/6 com (EAE).....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	- Barreira hematoencefálica
CFA	- Adjuvante Completo de Freud
COX-2	- Ciclo-oxigenase-2
EAE	- Encefalomielite autoimune experimental
ELISA	- Ensaio imunoenzimático
EM	- Esclerose múltipla
FDA	- Food and Drug Administration
FoxP3	- Fator de transcrição envolvido em respostas imunitária adquirida
GATA	- Fator de transcrição
HE	- Hematoxilina e eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
ICAM	- Molécula de adesão intracelular
VCAM	- Molécula de adesão vascular
IL	- Interleucina
KO	- Nocaute
iNOS	- Óxido nítrico-sintase induzível
INF- $\beta$	- Interferon beta
INF- $\gamma$	- Interferon gama
LPS	- Lipopolissacarídeo
MCP-1	- Proteína quimiotática de monócitos-1
MBP	- Proteína básica de mielina
MOG	- Glicoproteína associada ao oligodendrócito
NF-kB	- Fator nuclear kappa B
NO	- Óxido nítrico
PLP	- Proteolípídeo da mielina
PBS	- Salina tamponada com fosfato
PBS-T	- Salina tamponada com fosfato e Tween 20
ROR $\gamma$ t	- Fator de transcrição envolvido em resposta imunitária adquirida
SNC	- Sistema nervoso central
STAT	- Gene transdutor de sinal e ativador da transcrição
T-bet	- Fator de transcrição

TGF- $\beta$  - Fator estimulante de colônia de granulócitos beta (transforming growth factor)

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

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Histologia do sistema nervoso central.....	18
2.2. Esclerose múltipla (EM) .....	20
2.3. Encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	23
2.4. Imunopatologia da encefalomielite autoimune experimental (EAE) e da esclerose múltipla (EM) .....	25
2.5. Tratamento da esclerose múltipla (EM).....	29
2.6. Ácido caurenóico (KA) .....	31
3. HIPÓTESE.....	34
4. OBJETIVOS .....	35
4.1. Objetivo geral .....	35
4.2. Objetivos específicos.....	35
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1. Obtenção do ácido caurenóico (KA).....	36
5.2. Animais de experimentação .....	36
5.3. Grupos experimentais.....	37
5.4. Indução da EAE.....	37
5.5. Tratamento após a indução da EAE.....	37
5.6. Avaliação dos sinais clínicos.....	38
5.7. Obtenção dos esplenócitos.....	38
5.8. Análise dos níveis de nitrito.....	38
5.9. Dosagem de citocinas por ELISA.....	40
5.10. Obtenção e preparo do tecido nervoso.....	40
5.11. Colorações histológicas e imunoistoquímica .....	40
5.11.1. Hematoxilina e Eosina .....	40
5.11.2. Hematoxilina Férrica De Weigert-Pal-Russel .....	41
5.11.3. Imunoistoquímica .....	41
5.12. Análise Histológica.....	42
5.12.1. Avaliação histopatológica em coloração HE.....	42
5.12.2. Avaliação histopatológica em coloração por Hematoxilina Férrica De	43

Weigert-Pal-Russel.....	
5.12.3. Avaliação Imunoistoquímica.....	44
5.13. Análise estatística.....	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crônica, inflamatória e progressiva que acomete o sistema nervoso central (SNC), resultante de uma resposta autoimune, onde as células atacam componentes específicos da bainha de mielina ou dos oligodendrócitos. É caracterizada pela resposta aberrante de células T autorreativas, juntamente com a disfunção da rede de regulação do sistema imunológico. O resultado é uma reação inflamatória, de evolução crônica, que conduz à desmielinização axonal, danos no tecido perivascular e parênquima do SNC, com infiltrado de linfócitos T, macrófagos, proliferação e ativação da micróglia e astrócitos residentes, bem como na ativação de células dendríticas periféricas. Estes danos retardam ou bloqueiam as mensagens entre o cérebro e o corpo, levando aos sintomas observados nos pacientes com EM (MURTA, FERRARI, 2013; SHEREMATA & TORNES, 2013; KIPP et al., 2017; MCGINLEY et al., 2018).

Contudo, apesar dos danos gerados pela resposta inflamatória, o SNC apresenta mecanismos de neuroplasticidade e, com isso, pode ocorrer a remielinização, especialmente após a fase aguda inicial da doença, devido à diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos, responsáveis pela remielinização dos axônios lesados. A remielinização, no entanto, é incompleta e esta capacidade de regeneração diminui drasticamente com a evolução da doença. Assim, o curso inicial da EM é caracterizado por episódios de disfunção neurológica que, geralmente, tem remissão completa ou podem ocasionar déficits residuais. No entanto, ao longo do tempo, as alterações neuropatológicas ocasionadas pela ativação microglial generalizada, associada à extensa neurodegeneração, levam à deficiência progressiva (CONSTANTINESCU et al. 2011; KIPP et al., 2017).

Com isso, a EM apresenta curso clínico variável em reflexo dos danos aleatórios causados ao SNC e, assim, os sintomas apresentados podem ser diferentes entre indivíduos doentes, dificultando também o diagnóstico precoce (ZANDIEH et al., 2013). No início, a EM pode não ser alarmante e se manifestar como leve formigamento e discreta falta de coordenação de movimentos. Nos casos mais graves, o distúrbio se anuncia com intensos sinais de disfunção medular aguda, inclusive paralisia das pernas e

incontinência urinária. Os sintomas tendem a regredir temporariamente (remissão) em questão de dias ou semanas, podendo retornar (surto) em intervalos de meses ou anos, com intensidade gradualmente maior (CORRÊA et al., 2010; OJEDA, 2013; MCGINLEY et al., 2018).

Segundo a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (2019) a doença pode ser clinicamente caracterizada por períodos de surtos e remissão, observados em, aproximadamente, 85% a 90% dos pacientes. Entretanto, quando as lesões estabelecidas nos períodos de surtos se tornam permanentes o curso clínico é classificado como fase secundária e progressiva. Quando tal sequela persiste, a área de neurodegeneração é menos sensível aos tratamentos utilizados no início da doença, como por exemplo, os corticoides (MORRIS, YIANNIKAS, 2012; ZANDIEH et al., 2013).

Além da heterogeneidade clínica, existe também a heterogeneidade patológica. A correlação patológica dos surtos é caracterizada pelo rompimento da barreira hematoencefálica (BHE), correspondendo à presença de infiltrado inflamatório com várias células do sistema imunológico e por processo de desmielinização ativa do SNC, característica encontrada, principalmente, nas lesões agudas. A perda axonal é mais grave nas placas crônicas, presente tanto na substância branca como na substância cinzenta. A interação entre os vários componentes do sistema imunológico e todos os elementos do SNC determina a patogênese da EM (CONSTANTINESCU et al., 2011; WALKER et al., 2011; MURTA, FERRARI, 2013).

Estima-se que cerca de 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo sejam portadores de EM, com prevalência de 1:1000 nas populações caucasianas (MORRIS e YANNIKAS, 2012; MCGINLEY et al., 2018). No Brasil, a região sudeste apresenta a maior taxa de prevalência, aproximadamente 15 casos/100.000 habitantes. Contudo, existem regiões onde o número de casos é inferior a 5 casos/100.000 habitantes (RIBEIRO et al., 2011; LANA-PEIXOTO et al., 2012; MARRIE et al., 2013; OJEDA, 2013).

A EM afeta predominantemente mulheres, caucasianas, com picos de incidência entre os 20 e 40 anos. As primeiras manifestações costumam ocorrer no início da vida adulta, se desenvolvendo progressivamente com o passar dos anos, representando uma importante causa de morbidade e de grande impacto socioeconômico, uma vez que traz um impacto profundo nas

escolhas de vida dos pacientes, incluindo educação, carreira e planejamento familiar (BERTO et al., 2011; TULLMAN, 2013; CHEN et al., 2014; MCGINLEY et al., 2018).

Devido à limitação de estudos em humanos, à dificuldade do acesso ao tecido afetado e à rara realização de autópsias, os modelos animais surgiram como alternativa para o estudo dos aspectos clínicos e histopatológicos de doenças humanas desmielinizantes. Logo, muito do que se sabe hoje sobre a resposta imunológica e tratamentos na EM é devido aos estudos desenvolvidos nesses modelos (PÖLLINGER, 2012; MCGINLEY et al., 2018).

Com isso, vários elementos da cascata de eventos que levam ao surgimento da EM têm sido identificados, testados ou confirmados em modelos experimentais, como modelo da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). Do ponto de vista da patogênese, a EAE é um bom modelo para o estudo de mecanismos de EM, e também para os subsequentes testes e desenvolvimento de novos medicamentos (FAROOQI et al., 2010; KIPP et al., 2017).

Apesar de ainda não existir um modelo animal capaz de abranger toda a heterogeneidade da EM e suas variedades clínicas e histológicas, se a escolha do modelo for realizada de maneira apropriada para a pesquisa em questão é provável que os resultados obtidos forneçam descobertas aplicáveis à patologia em humanos (DENIC et al., 2010).

O modelo animal experimental da EAE é o mais aceito para estudos sobre a EM, podendo ser induzido em roedores e outros animais susceptíveis por meio da imunização com antígenos da mielina, como a glicoproteína de mielina de oligodendrócitos (MOG). A EAE é uma doença complexa, na qual a interação entre uma variedade de mecanismos clínicos, imunopatológicos, neuropatológicos e histopatológicos se aproxima das principais características observadas na EM (MIX et al., 2008; MIX et al., 2010; WALKER et al., 2011; KIPP et al., 2017).

Neste sentido, sabe-se que a patogênese, tanto da EAE como da EM, é mediada por células T autorreativas, ocorrendo através de mecanismo sinérgico de atuação entre células Th1 e Th17. Células Th1 secretam interferon gama (INF- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), os quais estão intimamente associados com a gravidade clínica da EAE. Já as células Th17, produtoras de IL-17, são um subconjunto de células T CD4<sup>+</sup> distinto, capazes

de mediar a patologia no SNC da EAE (CORRÊA et al., 2010; SONG et al., 2013; FONTES et al., 2014; MCGINLEY et al., 2018).

As células Th1 e Th17 são também capazes de recrutar outras células inflamatórias, como macrófagos, para as lesões do SNC por meio da produção de várias citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias. Além disso, estas células produzem espécies reativas de oxigênio, como o óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), as quais causam degeneração axonal (FONTES et al., 2014; DIAS et al., 2014; MCGINLEY et al., 2018). Assim, a resposta imunológica que se instala causa alterações focais na BHE, alterando sua permeabilidade por meio do aumento da expressão de moléculas de adesão celular, permitindo o tráfego de linfócitos a partir da periferia para o SNC (CONSTANTINESCU et al., 2011; WALKER et al., 2011; MURTA, FERRARI, 2013).

Dessa forma, a presença de infiltrados inflamatórios linfocitários abundantes na região das meninges e nas áreas perivasculares é característica marcante na análise histopatológica na EM, sobretudo na fase de surtos. Nas placas, o infiltrado celular está associado com a destruição da mielina e a disfunção de oligodendróglia. Esses mecanismos estão diretamente associados às características clínicas observadas, como a fadiga e a perda das funções cognitivas (LASSMANN, 2010; CONSTANTINESCU et al., 2011).

Como, atualmente, não existe cura para EM, as terapias disponíveis são destinadas, principalmente, à redução do número de recidivas e objetivam retardar a progressão da doença. Além disso, como o processo inflamatório é o responsável pela desmielinização e a neurodegeneração, fármacos anti-inflamatórios e imunomoduladores são amplamente utilizados (LASSMANN, 2011; FONTES et al., 2014).

Os tratamentos para EM têm sido desenvolvidos, em grande parte, com base nos conceitos e processos envolvidos na imunopatogênese da EM, os quais têm possibilitado a identificação de novos alvos terapêuticos e a busca por fármacos mais específicos e efetivos. Contudo, além do alto custo, os medicamentos atualmente utilizados na clínica são apenas parcialmente eficazes, além de apresentarem efeitos secundários indesejáveis, tais como cefaléia, tontura e cardiotoxicidade (CONSTANTINESCU et al. 2011; DIAS et al., 2014; FONTES et al., 2014). Desta forma, a busca por novas terapias e/ou

novos fármacos que sejam mais seguros, eficazes e com menor custo se tornam necessárias (DIAS et al., 2014; FONTES et al., 2014).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais tem sido a estratégia mais bem-sucedida na descoberta de novos medicamentos (NEWMAN, CRAGG, 2016). Entre os produtos naturais, as plantas se destacam pela produção de diversas substâncias, conhecidas como metabólitos secundários. Além de importantes para a sobrevivência dos vegetais, estes compostos têm sido utilizados, há séculos, para o desenvolvimento de novos medicamentos (MISHRA, TIWARI, 2011; VALLI, et al., 2012; NEWMAN, CRAGG, 2016).

Ao longo das últimas décadas, a descoberta de novos potenciais terapêuticos para substâncias naturais vegetais, especialmente o anti-inflamatório, tem avançado significativamente (NEWMAN, CRAGG, 2016). Em relação à EM, pesquisas têm sido realizadas com substâncias naturais vegetais, avaliando-se, principalmente, suas ações imunomodulatórias no curso clínico da EAE (DE PAULA et al., 2008; CHEN et al., 2010; CHEN et al., 2014). Entre as substâncias naturais promissoras avaliadas estão alguns terpenos, como o  $\beta$ -cariofileno (FONTES et al., 2017) e o partenolido (CARVALHO et al., 2017).

Além destes, outros compostos naturais destacam-se pelo grande potencial farmacológico no tratamento da EM, como o ácido caurenico (KA). O KA é o principal terpeno encontrado nas raízes de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*, Asteraceae) e em outras plantas, como o guaco (*Mikania glomerata*) e as copaíbas (plantas do gênero *Copaifera* L., Fabaceae) (MELO et al., 2001; RUFATTO et al., 2013; GELMINI et al., 2013; DIAS et al., 2014).

Com relação ao seu potencial na EM, estudos têm demonstrado as atividades anti-inflamatória e imunomodulatórias do KA, o qual se mostra capaz de inibir vários mediadores, como óxido nítrico (NO), IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), (DIAZ-VICIEDO et al., 2008; CHOI et al., 2011). Além disso, estudos in vivo demonstraram que o KA é capaz de inibir ativação do gene fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B). Esse gene desempenha importante papel na regulação de grande número de genes envolvidos na resposta inflamatória, bem como na produção de várias citocinas, entre as quais as

envolvidas na imunopatogênese da EAE e da EM (HUESO-FLACÓN et al., 2011). Trabalhos realizados sugerem que as atividades anti-inflamatórias do KA estejam relacionadas à supressão do NF- $\kappa$ B (CHOI et al., 2011) e da ativação do fator Nrf2 (LYU et al., 2011). Além disso, KIM et al. (2017) demonstraram que o KA é capaz de ativar TGF- $\beta$  em camundongos C57BL/6.

Portanto, considerando que o KA é capaz de modular *in vitro* e *in vivo* a resposta inflamatória em diversos modelos experimentais, inibindo principalmente a ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de NO, IL-1, IL-6, e IFN- $\gamma$ , torna-se relevante estudar seus possíveis efeitos imunomodulatórios sobre a resposta inflamatória em camundongos C57BL/6 EAE-induzidos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. HISTOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O SNC compreende o cérebro, medula espinhal, retina e nervo óptico. Sendo que as duas últimas estruturas são consideradas extensões embriológicas do cérebro. Na formação do SNC, durante o desenvolvimento embrionário, as partes que contêm os corpos celulares dos neurônios ficam centralizadas e separadas das regiões formadas, basicamente, por axônios (DAY, 2005; LAJTHA, 2007; GARMAN, 2011; AARESTRUP, 2012).

Assim, existem no SNC regiões com alta concentração de corpos celulares de neurônios que em tecido fresco apresentam coloração acinzentada, sendo, por isso, denominadas de substância cinzenta. Por outro lado, existem regiões com alta quantidade de prolongamentos de neurônios, principalmente, de axônios. Estes axônios são envolvidos por oligodendrócitos, constituindo as fibras nervosas. Em órgãos frescos estas regiões apresentam coloração esbranquiçada e, em conjunto, formam a substância branca. A coloração adquirida pela substância branca é devido à grande quantidade de mielina nela presente, sendo a mielina parte do citoplasma dos oligodendrócitos (DAY, 2005; LAJTHA et al., 2007; ROBERT, 2011).

Desta forma, a substância cinzenta é o local de recepção e de integração de informações e resposta, enquanto a substância branca constitui as vias de comunicação entre o SNC e locais externos, assim como as vias de comunicação entre diferentes regiões do próprio SNC (GARMAN, 2011; ROBERT, 2011; AARESTRUP, 2012).

Já os neurônios são células especializadas na condução do impulso nervoso e constituem a unidade celular base do SNC. Estas células têm a capacidade de serem estimuladas por diversas substâncias químicas e sinais elétricos, os quais são responsáveis por gerar um potencial de ação que é transmitido ao longo da membrana. Os neurônios são constituídos por um corpo celular, também chamado pericário, e por prolongamentos. No corpo celular se situa o núcleo e uma grande porção de citoplasma que o envolve (GARMAN, 2011; AARESTRUP, 2012).

Os prolongamentos podem se apresentar como dendritos (prolongamentos múltiplos), localizados no corpo celular/pericário e na forma de axônio (geralmente como prolongamento único) sendo que toda a superfície celular está em contato com terminais ou botões sinápticos de outros neurônios, formando as chamadas sinapses. Entretanto, o SNC possui ampla variedade de neurônios com diferenças morfológicas e funcionais. De acordo com a função desempenhada, os neurônios podem ser classificados como sensitivos, motores ou interneurônios (DAY, 2005; ROBERT, 2011; AARESTRUP, 2012).

Além dos neurônios, o tecido nervoso possui outra população de células, denominadas células da glia ou células da neurógli. No passado, esse grupo era considerado apenas como provedor de suporte estrutural e metabólico para o neurônio executar a transmissão sináptica. Entretanto, hoje, sabe-se da existência de comunicação bidirecional entre as células da glia e os neurônios, participando assim, da modulação sináptica. As células da glia apresentam tamanho menor, e além de determinarem o suporte estrutural e funcional para os neurônios, fornecem nutrição, isolamento, realizam fagocitose e reparação no tecido nervoso, sendo a população predominante no SNC. A população glial se divide em células da micrógli (macrófagos especializados) e macrógli (astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann) (DAY, 2005; GARMAN, 2011; AARESTRUP, 2012). A estrutura microscópica normal do sistema nervoso central encontra-se na Figura 1.

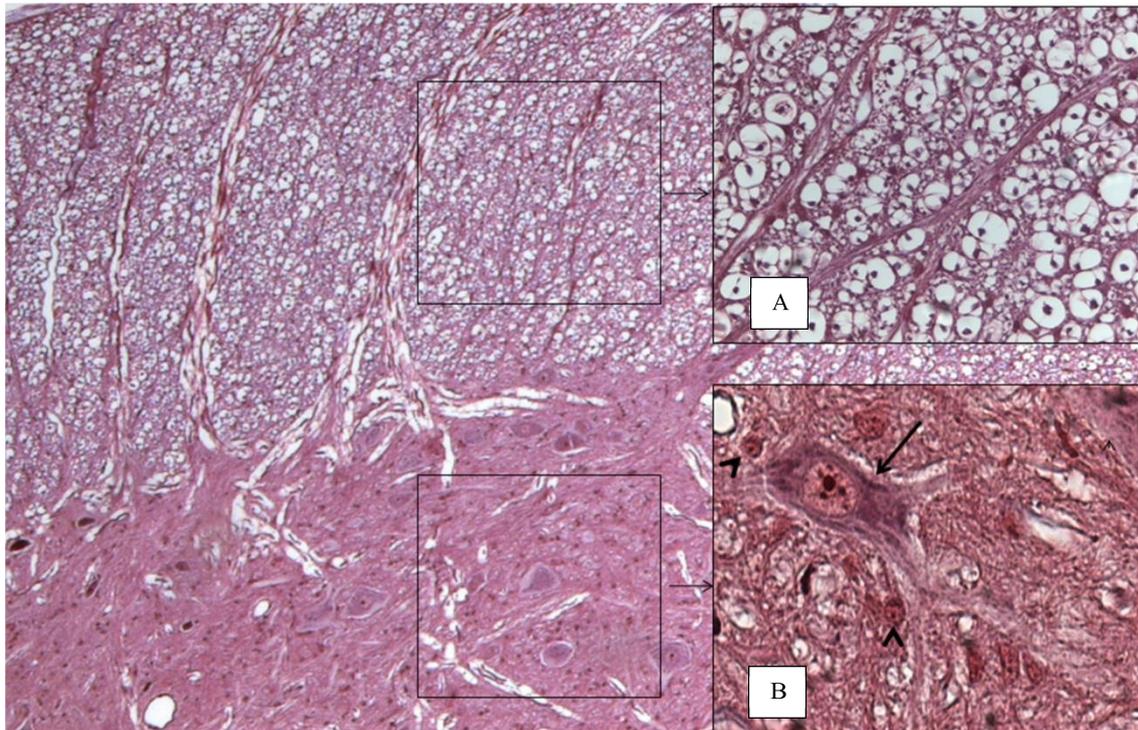


Figura 1: Cortes histológicos da substância branca (A), com axônios mielinizados e substância cinzenta (B) do sistema nervoso central, sendo o pericário (ou corpo celular) evidenciado pelas setas e cabeça de setas. Fonte: AARESTRUP, 2012.

## 2.2. ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

A EM é uma doença crônica de caráter progressivo, mediada por um mecanismo imunológico que acomete o SNC, sendo caracterizada por processo inflamatório inicial que leva à desmielinização, gliose e subsequente dano axonal (MCGINLEY et al., 2018; KIPP et al., 2017). A EM é considerada de origem autoimune, sendo mediada, principalmente, por linfócitos T auto-reativos que respondem a auto-antígenos do SNC. Patologicamente, a EM é marcada por regiões multifocais de desmielinização, perda axonal, perda de oligodendrócitos e cicatrizes astrogliais que resultam em déficit da função neurológica, a qual ocorre de maneira progressiva, levando a um posterior processo neurodegenerativo (FONTES et al., 2014; DIAS et al., 2014, DENDROU et al., 2015; KIPP et al., 2017; FONTES et al., 2017; MCGINLEY et al., 2018).

Entretanto, a natureza exata dos fatores que levam à patologia em questão permanece desconhecida e, apesar de estudos relacionarem vários fatores, como genéticos, ambientais, nutricionais, entre outros com a maior predisposição ao seu desenvolvimento, atualmente o que sabe-se é que a EM é uma doença complexa e multifatorial desenvolvendo-se em indivíduos geneticamente susceptíveis após exposição a fatores ambientais ainda não bem definidos (KAKALACHEVA e LÜNEMANN, 2011; OUADGHIRI et al., 2013; MCGINLEY et al., 2018).

Esta doença afeta cerca de 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo, por isso, causa de grave deficiência física em jovens adultos, especialmente as mulheres. A EM representa grande ônus socioeconômico, uma vez que a média de idade do início da doença é de 30 anos (SOSPEDRA, MARTIN, 2005; FLETCHER et al., 2010; KAKALACHEVA, LUNEMANN, 2011; ELLIOTT et al.; 2012; MURTA, FERRARI, 2013). Além disso, a manifestação clínica apresenta grande variação: em cerca de 85% a 90% dos pacientes o início é caracterizado por surtos e remissões, ou por uma progressão contínua, sendo que os surtos podem durar desde algumas horas a vários dias ou, até mesmo, semanas e, progressivamente, vão desaparecendo. São considerados surtos o aparecimento de disfunção neurológica com ausência de quadros febris ou de processos infecciosos num período superior a 24 horas (BRUCK 2005; SILVA et al., 2008; MORRIS, YIANNIKAS, 2012).

Devido ao fato da EM apresentar uma grande diversidade no que diz respeito ao local em que as lesões vão se desenvolver e também quanto à taxa de acúmulo da disfunção (COMPSTON; COLES, 2002), os pacientes foram agrupados por uma rede internacional de acordo com os sintomas e sinais clínicos, definindo, assim, quatro tipos distintos de curso da doença observado (REINGOLD, 1996; LUBLIN, 2007). A Esclerose Múltipla Remitente Recorrente (RR), com surgimento de surtos claramente definidos e é seguida da recuperação total ou parcial dos mesmos, sendo que a cada quadro de surto o paciente pode apresentar sequelas permanentes ou não, com déficit residual após cada recuperação, sendo que os períodos compreendidos entre as recidivas da doença são caracterizadas por uma falta na progressão dos sintomas e é a forma mais comum de manifestação. Ocorrendo, ainda na maioria dos casos, a evolução desses pacientes para a forma chamada de

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

O ponto chave da EM é a desmielinização primária dos axônios, já que a lesão a essas estruturas ocasiona o bloqueio total ou parcial dos sinais de condução. Logo, as manifestações neurológicas aparecem quando o bloqueio da condução acomete uma porção significativa de fibras que, de acordo com estudos imunopatológicos, podem estar presentes em diferentes locais. O curso das doenças desmielinizantes vai ser determinado então, em parte, pelos mecanismos de neuroplasticidade do SNC. Com isso, os quadros clínicos podem variar em cada indivíduo (FLECTHER et al., 2010; ELLIOTT et al., 2012; MURTA, FERRARI, 2013), podendo, então, afetar todas as porções do SNC e as lesões levam a sintomas de disfunção neural como manifestações motoras, sensoriais, cerebelares, autonômicas, psiquiátricas e anormalidade nos nervos cranianos (SOSPEDRA, MARTIN, 2005; CORRÊA et al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013).

Tanto na EM quanto na EAE o alvo das células autoimunes é, portanto, a unidade de oligodendrócitos-mielina. A desmielinização é mediada por uma série de mecanismos efetores, incluindo linfócitos e citocinas derivadas de macrófagos, radicais de oxigênio, óxido nítrico, metaloproteinases de matriz, anticorpos, complemento e células fagocíticas, incluindo macrófagos e micróglia. Na ausência de remielinização eficaz irá ocorrer a degeneração axonal, a qual constitui a base para a natureza progressiva clínica destas doenças (LASSMANN, 2010, 2011; CHU et al., 2018).

A vasculatura do SNC é especializada em manter este sistema em um ambiente imuno-privilegiado. A barreira hematoencefálica (BHE) representa

tanto uma unidade anatômica quanto funcional, mediando o transporte molecular e a regulação imune. Embora o endotélio seja a principal barreira física, periócitos e astrócitos firmemente associados contribuem para a função de barreira e, em conjunto com o endotélio, micróglia e neurônios de ligação, compreendem a unidade neurovascular (BRUCK, 2005; LASSMANN, 2010, 2011).

Entretanto, durante a neuroinflamação, as citocinas produzidas pelas células T patogênicas, os macrófagos residentes e a micróglia do cérebro medeiam a regulação positiva de moléculas de adesão. Isto conduz à ativação, resultando no influxo de células imunes para o SNC. A BHE também secreta quimiocinas e citocinas estimulando, deste modo, a proliferação e recrutamento de células inflamatórias para o SNC, como observado na EAE (BRUCK, 2005; CHU et al., 2018).

### 2.3. ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

A EAE é uma doença inflamatória do SNC que apresenta muitos aspectos clínicos, morfológicos e histológicos em comum com a EM humana. Este modelo de doença autoimune órgão específica é amplamente utilizado, sendo induzido por meio da imunização ativa ou da transferência adotiva de células T CD4+ reativas contra a mielina (MIX et al., 2010; KIPP et al., 2017). De acordo com o tipo de animal utilizado e o material escolhido para indução há diferentes variações do modelo EAE, como consta na Tabela 1 (MIX et al., 2010; CROXFORD et al., 2010).

O modelo mais utilizado para indução da EAE é o de imunização de camundongos da linhagem C57BL/6, geneticamente suscetíveis a doença, pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. A EAE em camundongos C57BL/6 é altamente reprodutível e previsível, com os animais apresentando paralisia de caráter ascendente, sendo um padrão semelhante ao encontrado na EM (CROXFORD et al., 2010; MIX et al., 2010; KIPP et al., 2017).

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

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

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

Por serem geneticamente modificados, os camundongos C57BL/6 expostos a antígenos da mielina expressam maior número de receptores de células T para MOG e maior título de anticorpos anti-MOG, resultando em uma

forma mais grave da EAE (CROXFORD et al., 2010; MIX et al., 2010; KIPP et al., 2017). Essa forma mais grave da EAE se caracteriza por lesões inflamatórias e desmielinizantes em nervo óptico, cérebro e medula espinhal. Além disso, os infiltrados inflamatórios são perivasculares, constituídos principalmente por macrófagos e linfócitos T, podendo ocorrer ainda algum grau de resposta humoral com formação de títulos significativos de anticorpos anti-MOG (CROXFORD et al., 2010; MIX et al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013; KIPP et al., 2017).

#### 2.4. IMUNOPATOLOGIA DA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE) E DA ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

Tanto a EM quanto a EAE são consideradas doenças autoimunes mediadas por linfócitos T CD4+, manifestando-se clinicamente por deficiência neurológica, histologicamente por presença de infiltrado perivascular de células mononucleares no encéfalo e, imunologicamente, pela presença de resposta celular e humoral aos componentes da mielina (FLETCHER et al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013; CHENG et al., 2017; CHU et al., 2018; BJELOBABA et al., 2018).

Os linfócitos T CD4+ (T helper) podem ser divididos classicamente em 4 subpopulações de respostas imunes adaptativas: Th1, Th2, Th17 e Treg. As células Th1 secretam especificamente o INF- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  e as Th2 são responsáveis pela liberação de citocinas, como IL-4, IL-5 e a IL-13. A diferenciação das células TCD4+ no subtipo Th1 acontece por ação da IL-12, a qual ativa os fatores de transcrição T-bet e STAT4. Já o processo de diferenciação em Th2 é induzido pela IL-4 e pelos fatores de transcrição GATA3 e STAT5. Para a diferenciação em Th17, o linfócito naive “virgem” deve ser estimulado pela IL-6, sendo que a IL-1 também é capaz de estimular essa diferenciação. Essas citocinas ativam os fatores de transcrição ROR $\gamma$ t e STAT3. E, por fim, a diferenciação em Treg ocorre pelo estímulo de citocinas TGF- $\beta$  e IL-6 em presença de ácido retinoico, já que esses ativam os fatores de transcrição FoxP3 e STAT5 (BETTELLI et al., 2006; VELDHONEN et al., 2006; FLETCHER et al., 2010; MURTA, FERRARI, 2013; CHENG et al., 2017; CHU et al., 2018; BJELOBABA et al., 2018).

No modelo anteriormente proposto para EAE e EM, as células T helper CD4<sup>+</sup> eram classificadas em dois subtipos Th1 e Th2 com diferentes funções e perfis de citocinas produzidas. E o perfil classicamente envolvido na EAE era o do tipo Th1. O efeito danoso do IFN- $\gamma$ , produzido por células Th1, no processo de desmielinização foi confirmado com descrição da IL-12, uma interleucina indutora de IFN- $\gamma$  que também está aumentada na EM. No entanto, a observação que animais geneticamente deficientes para IFN- $\gamma$  ou para seu receptor específico também desenvolviam EAE, sugeriu a existência de outra subpopulação de linfócitos efetores nesse modelo (BETTELLI et al., 2006; CHENG et al., 2017; MCGINLEY et al., 2018; CHU et al., 2018; BJELOBABA et al., 2018).

Já o papel dos linfócitos Th17, especializados na produção de IL-17, na EAE e EM tem sido muito estudado nos últimos anos (CHU et al., 2018; MCGINLEY et al., 2018). As células Th17 foram identificadas, a partir da descoberta da IL-23, outro subtipo de células TCD4<sup>+</sup> que secreta a IL-17. A importância da Th17 na EAE foi demonstrada em animais nocaute (KO) para IL-17 que apresentaram resistência parcial à doença (MCGINLEY et al., 2018). Assim, o fato da proteção apresentada em animais KO ser parcial mostra que a EAE não é resultado de uma resposta Th17 isolada, mas sim, de uma resposta Th1 e Th17 associadas, além do uso de anticorpos anti-IL-17 ter demonstrado proteção parcial contra o desenvolvimento da doença. Já na EM o papel da Th17 também foi considerado, uma vez que foi encontrado aumento da transcrição da IL-17 em lesões de EM. Amostras de LCR de pacientes com EM possuem níveis aumentados de IL-17 quando comparados com amostras de pacientes saudáveis. Além do fato de linfócitos T de memória que induzem a expressão de IL-17 e IL-23 serem capazes de passar pela BHE, promovendo, assim, a inflamação no SNC (ZHOU, et al., 2007; WEI et al., 2007; CHENG et al., 2017; MCGINLEY et al., 2018; BJELOBABA et al., 2018).

Além disso, estudos demonstram a importância da IL-17 tanto na EM quanto na EAE, principalmente no estabelecimento das doenças. A IL-17 é uma citocina com efeitos pleiotrópicos (podendo atuar sobre muitos tipos celulares diferentes) que levam à expressão de outras citocinas, como a IL-1, IL6, IL-8, TNF- $\alpha$ , fator estimulante de colônia de granulócitos (TGF  $\beta$ ) e MCP-1

(promove a atração de monócitos, linfócitos T e células NK para o sítio de inflamação) em vários tipos de células. Os receptores de IL-17 e IL-22 foram encontrados nas células endoteliais da BHE de pacientes com EM. No modelo da EAE, o contato com as IL-17 e IL-22 leva ao rompimento das junções intracelulares, facilitando a migração dos linfócitos Th17 autorreativos para o SNC (HARRINGTON et al., 2005; KEBIR et al., 2007; CHENG et al., 2017; MCGINLEY et al., 2018; BJELOBABA et al., 2017; CHU et al., 2018).

Na fase de recuperação da EAE, citocinas inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  foram identificadas, tanto no SNC como na periferia. Vários estudos têm demonstrado a importância da ação da IL-10 no controle da EAE, devido ao seu efeito imunorregulador. A IL-10 foi descrita primeiramente como uma interleucina produzida pelas células Treg que inibe a produção de citocinas pelas células Th1. Foi demonstrado que a IL-10 inibe a produção de uma grande variedade de citocinas produzidas pelas células T, afetando a apresentação de antígeno e a co-estimulação mediada por células apresentadoras de antígenos, que são fundamentais para o desencadeamento da resposta imune celular. Assim, o aumento da IL-10 leva à redução significativa da gravidade da doença (MOORE et al., 2001; DAI et al., 2012).

Além da IL-10, o TGF- $\beta$  possui importante função na EAE, podendo exercer tanto a indução de células T, com função reguladora e imunossupressora (Treg), como o desenvolvimento de células pró-inflamatórias Th17. O fator crucial na diferenciação celular em Treg ou Th17 são os perfis de citocinas presentes no meio onde ocorre a diferenciação. Geralmente, o TGF- $\beta$  induz à expressão de Foxp3 levando à diferenciação de Treg. No entanto, sob condições inflamatórias induz, juntamente com a IL-6, uma diferenciação em células Th17. Em paralelo, o aumento da expressão do TGF- $\beta$  em astrócitos e micróglia melhora o curso da doença EAE (THÖNE et al., 2012; LEE et al., 2017).

Uma vez ativadas na periferia, as células T podem atravessar a BHE e migrar para o SNC, liberando citocinas. Esta migração para o SNC com posterior liberação de citocinas dá início à sequência de eventos inflamatórios locais. O processo de extravasamento de leucócitos para as regiões de inflamação se dá, pela ativação de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1). Os linfócitos T ativados, após atravessarem o endotélio

vascular, precisam vencer uma barreira de matriz extracelular composta por colágeno tipo IV. Para facilitar a chegada dos linfócitos na substância branca do SNC, as metaloproteinases e gelatinases A e B são fundamentais, sendo inclusive detectáveis no LCR de pacientes com EM. Este processo é mantido pela ação de quimiotáticos como o C5a (fragmento de proteína liberada a partir de componente do complemento) e fator ativador de plaqueta (OSBORN et al., 1989; WEINER, 2009; LEE et al., 2017; BJELOBABA et al., 2018).

Na fase inflamatória da doença, 85% dos pacientes apresentam ataques agudos (surto) com recuperação completa dos sinais e sintomas. Estes surtos são atribuídos a ondas de células Th1 e Th17 que infiltram o SNC. O balanço entre estas células e as células reguladoras, como as Treg e Th2, é decisivo na determinação da atividade da doença. A fase progressiva da EM é reconhecida como secundária ao processo degenerativo desencadeado pela inflamação (HARRINGTON et al., 2005; GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2009).

O ataque à mielina é promovido pelas células fagocitárias (macrófagos da periferia e micróglia do SNC), as quais são recrutadas pela ação das citocinas inflamatórias liberadas. No SNC, a reativação das células T autorreativas pelas células apresentadoras de antígenos, como a micróglia, promove a amplificação local da inflamação. As células residentes (micróglia), ativadas no processo inflamatório, são as principais responsáveis pelo dano tecidual do SNC por meio da liberação de NO, radicais de oxigênio, aminas vasoativas, proteínas do complemento, proteases e citocinas (FIGUEROA-VEJA et al., 2008; LINKER et al. 2010). Neste ambiente ocorre a indução de diferentes mecanismos efetores, os quais incluem a citotoxicidade mediada por anticorpos, por NO e radicais de oxigênio (como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), citocinas tóxicas como o TNF- $\alpha$  e moléculas mediadoras de apoptose. O resultado é a agressão ao oligodendrócito, à bainha de mielina e ao axônio e, conseqüentemente, sintomas neurológicos (STEINMAN, 1996; STEINMAN et al., 2005; BJELOBABA et al., 2017).

Com isso, os tratamentos para a EM objetivam diminuir a atividade do sistema imunológico, retomando as funções normais do indivíduo após um ataque, impedindo novos surtos, prevenindo assim, a ocorrência de deficiência, já que a cura ainda não existe (MORRIS, YIANNIKAS, 2012).

## 2.5. TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Os primeiros fármacos utilizados no tratamento da EM, principalmente durante a fase de surtos, foram os corticosteroides, os quais são ainda utilizados e agem diminuindo o infiltrado celular inflamatório no SNC. No entanto, estes medicamentos apresentam vários efeitos indesejáveis como aumento da pressão arterial, erupção cutânea, osteoporose, síndrome de Cushing, entre outros (BISAGA et al., 2012; MORRIS, YIANNIKAS, 2012; KIPP et al., 2017).

Atualmente, as terapias disponíveis para o tratamento da EM são voltadas para a diminuição do risco de ocorrência de novos surtos e da progressão da incapacidade neurológica (BISAGA et al., 2012; MORRIS, YIANNIKAS, 2012; KIPP et al., 2017; FONTES et al., 2017). Assim, nos últimos anos, vários medicamentos, conhecidos como modificadores da doença foram desenvolvidos com intuito de promover o controle parcial da EM. Contudo, apesar de eficácia significativa, estes medicamentos apresentam alto custo e também produzem diversos efeitos adversos, sendo que alguns medicamentos ainda necessitam de administração parenteral (MORRIS, YIANNIKAS, 2012; KIPP et al., 2017).

Os fármacos imunomodulatórios que constituem a terapia de primeira linha são representados pelo Interferon- $\beta$  e acetato de glatirâmer. O IFN- $\beta$  possui uma complexa atividade imunomoduladora, diminuindo citocinas inflamatórias como IL-12 e aumentando as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Já o acetato de glatirâmer é constituído por uma mistura de polipeptídeos sintéticos estruturalmente semelhante à proteína básica da mielina, porém sem causar encefalite. Os mecanismos propostos para a atividade biológica deste medicamento são a indução de células T supressoras antígeno-específico e a inibição competitiva com os antígenos da Proteína Básica da Mielina (FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012). Contudo, estes medicamentos são parcialmente efetivos, com resultados abaixo do esperado, sendo que cerca de 30% dos pacientes com EM recorrente-remitente podem desenvolver reincidências, além de poderem produzir anticorpos anti-IFN- $\beta$  (FLETCHER et al., 2010; KIPP et al., 2017).

Já a segunda linha de tratamento é constituída principalmente por fármacos que incluem o natalizumab, mitoxantrona e fingolimod (CHIBA, ADACHI, 2012; BISAGA et al., 2012; KIPP et al., 2017). O natalizumab é um anticorpo monoclonal contra  $\alpha$ -4 integrina da glicoproteína expressa em linfócitos e monócitos, essenciais para o processo de migração através da barreira hematoencefálica. Desta maneira, o principal mecanismo de ação do natalizumab é o bloqueio da migração de células inflamatórias, principalmente linfócitos, para dentro do SNC (CHIBA, ADACHI, 2012; BISAGA et al., 2012). Já a mitoxantrona é um derivado antraquinônico imunossupressor que se liga ao DNA produzindo quebra das fitas, inibindo assim, tanto a síntese do DNA quanto do RNA (MORRIS, YIANNIKAS, 2012). O Fingolimod foi obtido por meio de modificação molecular de uma substância natural isolada do fungo *Isaria sinclairii*. O fingolimod atua impedindo a migração de células T para o SNC, uma vez que esta substância é capaz de bloquear a ação do receptor esfingosina-1-fosfato em células T, o qual está envolvido na regulação do movimento destas células no organismo (CHIBA, ADACHI, 2012). Contudo, apesar destes medicamentos possuírem certa eficácia, também apresentam vários efeitos colaterais, como cefaleia, tontura, vômitos e, em alguns casos mais graves, cardiotoxicidade e infecções respiratórias e urinárias (BISAGA et al., 2012; MORRIS, YIANNIKAS, 2012; KIPP et al., 2017).

Outros medicamentos que foram aprovados para a EM pelo FDA (Food and Drug Administration) incluem a teriflunomida e o dimetilfumarato. A Teriflunomida é um imunomodulador que reduz a ativação, proliferação e função dos linfócitos T e B, porém, possui como efeitos adversos hepatotoxicidade e riscos de mal formação congênita. Já o dimetilfumarato age conferindo proteção ao SNC devido às propriedades antioxidantes via Nrf2, um fator de transcrição importante na proteção contra o estresse oxidativo. Assim, tendo em vista o grande número e gravidade de efeitos adversos, os avanços recentes ainda estão distantes de uma abordagem curativa para os portadores da EM. Dessa forma, torna-se importante pesquisas que busquem alternativas terapêuticas eficazes, tanto clinicamente como economicamente e que forneçam além da eficácia farmacológica menores efeitos adversos (BISAGA et al., 2012; CHIBA, ADACHI, 2012).

## 2.6. ÁCIDO CAURENOICO (KA)

O ácido caurenoico (KA, Figura 2) é um diterpeno tetracíclico pertencente à classe dos cauranos (GELMINI et al., 2013), sendo encontrado em várias espécies vegetais. Entre as principais plantas medicinais que o KA pode ser encontrado, destacam-se a *Mikania glomerata* Sprengel e *M. laevigata* Schultz (Asteraceae), popularmente conhecidas como guaco (RUFATTO et al., 2013). Estas espécies são popularmente utilizadas como broncodilatadoras, anti-inflamatórias e antitussígenas. A literatura reporta ainda a presença de KA em outras espécies vegetais de interesse medicinal, como nas raízes de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp) (ARÁOZ et al., 2010; GELMINI et al., 2013).

Além de presente em várias espécies vegetais medicinais, o KA também desperta grande interesse devido ao grande número de atividades biológicas que possui, como antimicrobiana e antifúngica (PADLA et al., 2012), antiespasmódica (AMBROSIO et al., 2004), tripanocida (IZUMI et al., 2012), antimalárica (BATISTA et al., 2013), leishmanicida (DOS SANTOS et al., 2013), anticonvulsivante (OKOYE et al., 2013) e vasorelaxante (TIRAPELLI et al., 2004; AMBROSIO et al., 2006).

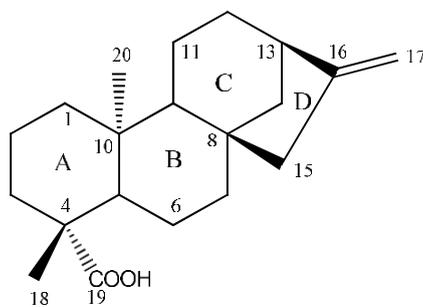


Figura 2. Estrutura química do ácido caurenoico (KA).

Adicionalmente, vários trabalhos têm sido realizados demonstrando o potencial anti-inflamatório do KA. Os trabalhos realizados *in vitro* demonstraram que KA inibiu a produção de NO, PGE<sub>2</sub> e TNF- $\alpha$ , bem como a expressão de iNOS e COX-2 (DIAZ-VICIEDO et al., 2008). Trabalhos semelhantes demonstraram que o KA (10 a 100  $\mu$ M) inibiu a produção de mediadores químicos, tais como PGE<sub>2</sub>, NO, assim como a expressão de COX-2 e iNOS em macrófagos RAW 264,7 ativados por lipopolissacarídeos (LPS). Neste mesmo

estudo, verificou-se que a inibição da expressão de COX-2 e iNOS está provavelmente relacionada à inibição da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (CHOI et al., 2011). Corroborando com estes estudos, os trabalhos realizados por Hueso-Falcón e colaboradores (2011) demonstraram que o KA e alguns de seus derivados inibiram in vitro a produção das citocinas IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em esplenócitos de camundongos BALB/c, sugerindo que tal inibição ocorreria pelo mecanismo de inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.

Da mesma forma, estudos in vivo demonstram que o tratamento oral de KA (10 a 30 mg/kg) é capaz de inibir a resposta inflamatória induzida por vários agentes, como carragenina e PGE<sub>2</sub>. Ainda, foi observado que o KA inibiu a produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (MIZOKAMI et al., 2012).

Além disso, a atividade imunomodulatória do KA foi avaliada em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/C, mostrando que o KA (70 a 90  $\mu$ M) induz o aumento de IL-10 (MACRI et al., 2014). Adicionalmente, os trabalhos realizados por VERRI e colaboradores (2012) também demonstram que o KA (100 mg/kg, i.p.) promove significativa diminuição da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e também da atividade da MPO.

Outros estudos mostraram que o KA (10 a 100 mg/kg) reduziu o edema de pata e inibiu a inflamação induzida por carragenina, CFA e ovalbumina, bem como reduziu a colite induzida por ácido acético (PAIVA et al., 2002; LIM et al., 2009). Com relação à colite induzida em ratos, o KA (50 e 100 mg/kg/dia) promoveu a melhora clínica dos animais, a diminuição do infiltrado inflamatório, bem como a diminuição de edemas nos animais avaliados (PAIVA et al., 2002).

A ação antinociceptiva in vivo do KA foi demonstrada nos modelos animais de contorções abdominais, placa quente e teste de formalina (CHAVAN et al., 2012; MIZOKAMI et al., 2012). Os autores sugeriram que estas atividades estejam relacionadas à inibição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e inibição da COX-2 (MIZOKAMI et al., 2012).

Além disso, SOSA-SEQUERA e colaboradores (2010) também evidenciaram a atividade anti-inflamatória in vivo do KA em modelo de edema de pata induzido por CFA e por ovalbumina. Já no estudo de BOLLER e colaboradores (2010), foi verificado que o KA inibiu o edema de orelha induzido por capsaicina, diminuindo a migração de células porlimorfonucleares.

Adicionalmente, trabalhos realizados sugerem que as atividades anti-inflamatórias do KA estejam relacionadas, sobretudo, à supressão do NF- $\kappa$ B (CHOI et al., 2011) e à ativação do fator Nrf2 (LYU et al., 2011). KIM et al. (2016) evidenciaram que o KA é capaz de reduzir a inflamação pulmonar, sendo o mecanismo de atividade anti-inflamatória relacionado à ativação de Nrf2. Recentemente, KIM et al. (2017) demonstraram que o KA é capaz de ativar o TGF- $\beta$  em camundongos C57BL/6.

Portanto, considerando que o KA é capaz de modular a resposta inflamatória em diversos modelos experimentais, inibindo a ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de NO, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , bem como outros mediadores, torna-se relevante estudar seus possíveis efeitos imunomodulatórios sobre a resposta inflamatória em camundongos C57BL/6 EAE-induzidos.

### 3. HIPÓTESE

As atividades anti-inflamatórias demonstradas pelo ácido caurenóico (KA) levam à melhoria dos sintomas clínicos e das alterações histopatológicas do SNC em camundongos C57BL/6 induzidos com EAE, bem como à diminuição de citocinas inflamatórias e da expressão tecidual de IL-17 nos animais.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos in vivo do ácido caurenico sobre a evolução clínica e sobre os aspectos histopatológicos do SNC, empregando a EAE como modelo de estudo da EM.

### 4.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do ácido caurenico, por meio de escores clínicos, sobre o curso clínico da EAE, induzida em camundongos C57BL/6;
- Avaliar os efeitos do ácido caurenico sobre os níveis de nitrito e das citocinas IL-4, IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidas em cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6;
- Investigar os efeitos do ácido caurenico sobre um padrão histológico no SNC, utilizando colorações realizadas por Hematoxilina e Eosina, bem como coloração para mielina de Weigert – Pal – Russel;
- Investigar os efeitos do ácido caurenico sobre um padrão histológico no SNC por imunistoquímica, por meio da determinação de células que expressam IL-17.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Obtenção do ácido caurenóico (KA)

O ácido caurenóico foi obtido como substância pura, sendo isolado e cedido pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. O KA foi isolado a partir das raízes de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), as quais foram coletadas em julho de 2013, no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. A exsiccata do vegetal foi depositada no Herbário VIC – Viçosa, da UFV, sob número de tombo 41.713, e identificada por Fernanda Lobão Gotti. Em seguida, as raízes de Yacon foram cortadas em pequenos pedaços e estas foram levadas à estufa a 45 °C para secagem do material vegetal. Após secagem, o material obtido foi triturado com auxílio de moinho de facas, resultando em 1800 g de pó. O pó assim obtido foi submetido à maceração em clorofórmio. O extrato clorofórmico obtido das raízes de Yacon foi submetido à processos cromatográficos. Após várias etapas de isolamento e purificação, foram obtidas 600 mg de KA puro, o qual foi utilizado nos ensaios.

### 5.2. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas, com 8-12 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde os mesmos foram mantidos, e onde foram realizados os experimentos. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a utilização de animais de laboratório tendo sido autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFJF (Protocolo N° 029/2013).

### 5.3. Grupos experimentais

Ao todo foram utilizados 24 animais, os quais foram eutanasiados no 20º dia pós-indução da EAE (pico da doença no camundongo C57BL/6):

I Grupo controle (controle negativo): camundongos C57BL/6 sem indução da EAE e sem receber qualquer tipo de tratamento (veículo) (n:06);

II Grupo EAE (controle positivo): camundongos C57BL/6 com EAE e sem receber qualquer tipo de tratamento (somente veículo) (n:06);

III Grupo KA 50: camundongos C57BL/6 com EAE e tratados com ácido caurenico (KA) 50 mg/kg/dia, via oral (v.o.) (n:06);

IV Grupo KA 100: camundongos C57BL/6 com EAE e tratados com ácido caurenico (KA) 100 mg/Kg/dia, via oral (v.o.) (n:06);

As doses utilizadas de KA foram baseadas em trabalhos anteriores que demonstram a atividade anti-inflamatória in vivo desta substância por via oral (PAIVA et al., 2002; LIM et al., 2009; MIZOKAMI et al., 2012).

### 5.4. Indução da EAE

Os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.), em ambos os lados da base da cauda, com 100  $\mu$ g do peptídeo MOG<sub>35-55</sub>(Sigma) e adjuvante completo de Freund (Sigma) suplementado com 400  $\mu$ g de Mycobacterium tuberculosis (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, EUA). No dia da imunização e após 48 horas, foram injetados intraperitonealmente (i.p.) 300 ng de toxina pertussis (Sigma) por animal. Aos animais foram inoculados 100  $\mu$ L de emulsão antigênica e feita à marcação auricular dos grupos (CASTRO et al., 2012).

### 5.5. Tratamento após a indução da EAE

Após a indução da EAE e início do aparecimento dos sintomas, o ácido caurenico (KA) foi suspenso em PBS e administrado por via oral (gavagem, agulha de 20 mm) em 200  $\mu$ L na dosagem de 50 e 100 mg/kg/dia (PAIVA et al., 2002; LIM et al., 2009; MIZOKAMI et al., 2012).

## 5.6. Avaliação dos sinais clínicos

Após a inoculação, os animais foram observados diariamente, por duas horas, até o final do experimento e os sinais clínicos foram registrados de acordo com a Tabela 2 (PERON et al., 2010).

Tabela 2: Escore clínico dos camundongos C57BL/6 com EAE.

ESCORE	SINAIS CLÍNICOS
0	Sadio
1	Perda de tônus da cauda
2	Paralisia parcial patas traseiras
3	Paralisia severa patas traseiras
4	Paralisia severa patas traseiras e paralisia parcial dianteiras
5	Paralisia completa/óbito

## 5.7. Obtenção dos esplenócitos

Após eutanásia com xilasina (30mg/Kg) e quetamina (160mg/kg) (DAMY et al., 2010). O baço dos animais foi coletado de maneira asséptica e, após lavagem com solução de RPMI incompleto estéril, foi macerado em 5 mL desta mesma solução. As células foram centrifugadas (1200 rpm, 8 min, 4°C) e o botão celular ressuspense em solução de cloreto de amônio para lise das hemácias. Este processo foi repetido até completa lise das hemácias. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RMPI completo (10% SFB – soro bovino fetal) e incubadas em placas de 6 poços por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> transferido para tubos do tipo falcons de 15 mL para serem contados em câmara de Neubauer com azul de Tripán, avaliando-se aqui a viabilidade das células. Fazer-se-á, então, o ajuste de  $2 \times 10^6$  células/mL e colocadas em cultura por 48 horas, com ou sem estímulo. Após este procedimento o sobrenadante foi coletado para dosagens de citocinas e nitrito.

## 5.8. Análise dos níveis de nitrito

Após 48 horas de cultura, 100  $\mu$ L de sobrenadante de cultura de células peritoneais de cada animal a  $2 \times 10^6$  cels/mL foram colocados nos poços de

microplacas de ELISA com fundo chato. O sobrenadante foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente com 100  $\mu$ L do reativo de Griess (DING et al., 1988). Este reativo foi obtido misturando-se a solução A (50 mL de sulfanilamida 1%) com a solução B (50 ml de 0,1% dihidro-cloreto de naftiletlenodiamina diluído a 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - Sigma Co., St. Louis), volume a volume. A absorbância foi medida, utilizando-se um filtro de 540 nm em um leitor automático de ELISA (TP READER NM). A produção de nitrito foi quantificada através de comparação com uma curva padrão em concentrações variando de 3,12 a 100  $\mu$ M, sendo os resultados expressos em moles/mL.

### 5.9. Dosagem de citocinas por ELISA

As células foram cultivadas na densidade de  $2 \times 10^5$ /poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina (RPMI 5%, Sigma), em câmara úmida, a 37°C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Sobrenadantes foram coletados após 24h e congelados em freezer à -86°C para realização da técnica de ELISA. As placas de ELISA foram sensibilizadas com um primeiro anticorpo (anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4, anti-IL-6 e anti-IL17, (PeProtech Inc, New Jersey), diluídos em PBS e incubadas overnight a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tween 20 (PBST) por 4 vezes, foram bloqueadas com PBS-Tween 20 (PBST) + 10% BSA, por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes em PBST e, em seguida, adicionados os padrões (das citocinas citadas anteriormente) (PeProtech Inc, New Jersey) e as amostras dos animais utilizados no modelo experimental. As placas foram então incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas quatro vezes em PBST e o segundo anticorpo biotinizados (dos respectivos anticorpos primários) (PeProtech Inc, New Jersey) foram adicionados e incubados por mais 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, mais quatro lavagens com PBST foram realizadas e adicionado o conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/400 (SIGMA Co, St. Louis), seguido de incubação por 1 hora. Após este período, a reação foi revelada pela adição

do substrato contendo Tampão Citrato (pH 5,5), cromógeno OPD (1mg/mL) e água oxigenada 30% (10g/mL). A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N e a leitura feita em leitor de ELISA (TP READER NM) a 440 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrões recombinantes (as concentrações dos anticorpos e recombinantes foram de acordo com recomendações do fabricante (PeProtech Inc, New Jersey)).

#### 5.10. Obtenção e preparo do tecido nervoso

A retirada do encéfalo e da medula foi realizada por dissecação. Em seguida, os materiais do SNC foram mantidos imersos em soluções fixadoras de formol tamponado a 4% (4g de fosfato de sódio monobásico, 6,5 g de fosfato de sódio dibásico, 40mL de formol P.A e 900 mL de água destilada). Após a dissecação, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%), em banhos de 1 hora cada, sendo realizados 3 banhos em álcool absoluto. Posteriormente, foram clarificados em 3 banhos em xilol de 1 hora cada e, finalmente, realizada à impregnação em parafina em estufa a 58°C e a inclusão na parafina à temperatura ambiente. Os blocos foram então cortados, em micrótomo modelo Spencer 820, com espessura de 5 µm.

#### 5.11. Colorações histológicas e imunoistoquímica

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

##### 5.11.1. Hematoxilina e Eosina

Após a hidratação dos tecidos, estes foram corados durante 15 minutos pela hematoxilina de Harris. Para a preparação da hematoxilina de Harris, 5 g de hematoxilina foram dissolvidos em 50 mL de álcool absoluto e 100 g de alúmen de amônio em 1000 mL de água destilada aquecida. A seguir,

misturaram-se as duas soluções e, após fervura, foram adicionados 2,5 g de óxido de mercúrio, sendo reaquecido até tornar-se púrpuro escuro. Após a coloração com a hematoxilina de Harris, foram adicionados 2 a 4 mL de ácido acético glacial por 100 mL de solução, a qual foi filtrada antes do uso e o material lavado em água corrente por 5 minutos e água amoniacal (200mL de água destilada com 3 gotas de hidróxido de amônio). Em seguida, os cortes foram corados pela solução de eosina aquosa 1% durante 2 minutos e diferenciados em etanol a 70% (LUNA, 1968).

#### 5.11.2. Hematoxilina Férrica de Weigert – Pal – Russel

Após desparafinar as lâminas, estas foram lavadas em água corrente por 3 minutos e tratadas em solução aquosa de alúmen de ferro a 4% por 3 minutos. Após isto, as lâminas foram lavadas rapidamente em água corrente. Em seguida, coradas pela hematoxilina férrica de Weigert – Pal – Russel (Hematoxilina a 10% em álcool absoluto 20 mL, carbonato de lítio 1g em 80 mL de água corrente) por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas várias vezes em água e desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), a 5 minutos cada. Após foram diafanizadas com três banhos de xilol, a 5 minutos cada e, finalmente, secadas e montadas (BEHMER, 2003).

#### 5.11.3. Imunoistoquímica

Para a realização da imunoistoquímica as lâminas contendo o tecido epitelial foram, inicialmente, desparafinadas em estufa a 60°C, durante 1 hora. Em seguida, foram desparafinadas em três banhos de xilol, 5 minutos cada e, posteriormente, hidratadas em álcool nas concentrações 100%, 90% e 70%, 3 minutos cada. O passo final da hidratação das lâminas foi em banho em água destilada por 2 minutos. Após desparafinadas e hidratadas, foi realizado o bloqueio com o peróxido de hidrogênio a 30% em metanol (2,5 mL de peróxido de hidrogênio diluído em 47,5 mL de metanol), durante dois tempos de 30 minutos cada. Em seguida, após o bloqueio, as lâminas foram colocadas em PBS dentro de banho-maria a 92°C, por 40 minutos, para recuperação antigênica. Após transcorrido este tempo, foram resfriadas durante 20 minutos

e os tecidos marcados ao redor com caneta hidrofóbica. Antes do bloqueio das proteínas, em que o tecido foi coberto com o reagente bloqueador por 15 minutos (utilizando o reagente Background Sniper), foi realizada lavagem das lâminas em PBS por 1 minuto.

Em seguida, o excesso do reagente foi retirado com papel toalha e aplicado o anticorpo primário sobre os tecidos durante 1 hora. O anticorpo primário anti-IL-17 (diluição 1:100; Link Universal Trekkie) foi ressuscitado, previamente, em PBS (15,0 µL de anticorpo diluído em 1485,0 µL de PBS). Novo banho em PBS, por 2 minutos, foi realizado após o tempo marcado. O próximo passo foi a adição, no tecido, do anticorpo secundário (Link Universal Trekkie) por 20 minutos em câmara úmida e, após esse tempo, novo banho em PBS durante 2 minutos. A avidina (TrekAvidin HRP LabelStreptavidin), para marcação do complexo antígeno + anticorpo + anti-anticorpo, foi adicionada cobrindo o tecido nas lâminas em câmara úmida por 10 minutos; em seguida lavadas durante 2 minutos e adicionado o cromógeno (Betazoide DAB), diluído, previamente, em substrato (1 gota do cromógeno em 1 mL de substrato). O cromógeno foi deixado no tecido durante 5 minutos e após transcorrido o tempo as lâminas foram lavadas em dois banhos com água destilada, 2 minutos cada, e um terceiro banho com PBS durante 2 minutos. Após as lavagens, foi adicionado sobre as lâminas a hematoxilina de Erlich, filtrada, durante 2 minutos, para contracorar o tecido. A retirada do excesso de corante foi realizada em dois banhos de água destilada, 5 minutos cada. No processo final as lâminas foram desidratadas três vezes em álcool 100%, 1 minuto cada, e em três banhos de xilol, 1 minuto cada. Para visualização do microscópio, o tecido foi coberto com lamínula adicionando entelan, para fixação da mesma. As lâminas foram analisadas em aumento de 400x, em mesmo microscópio e programa das lâminas avaliadas em HE e toluidina. As células marcadas com anticorpo IL-17 e foram quantificadas e comparadas com o número de células não marcadas no mesmo campo.

## 5.12. Análise histopatológica

### 5.12.1. Avaliação histopatológica em coloração HE

Para investigar histopatologicamente os efeitos do tratamento nas lesões no SNC causadas pela EAE, nos cortes corados por HE, foram avaliados o infiltrado inflamatório, celularidade glial, organização das bainhas de mielina e alterações vasculares.

Todos os cortes foram observados em aumento de 200x, por dois profissionais com formação e experiência em histopatologia. A partir desta observação inicial, foram selecionadas, em aumento de 400x, duas áreas anatomicamente representativas de cada órgão (medula espinhal, cérebro e cerebelo) para captura digital por sistema computadorizado (câmera digital Axion Vision C5 acoplada a microscópio óptico Zeiss) (FONTES et al., 2017).

As fotomicrografias foram submetidas à histomorfometria semi-automática (ZEN 2012<sup>®</sup>, Zeiss) para quantificação do número de células inflamatórias por campo (FONTES et al., 2017). Os valores expressos por média aritmética simples por grupo. Nas mesmas fotomicrografias, as demais características foram analisadas descritivamente.

#### 5.12.2 Avaliação histopatológica em coloração histoquímica por Hematoxilina Férrica de Weigert – Pal – Russel

Para análise quantitativa da mielina, os cortes corados por Hematoxilina Férrica de Weigert – Pal – Russel foram avaliados em toda sua extensão (medula espinhal, cerebelo e cérebro). Para tal, os cortes foram analisados descritivamente para a avaliação da organização das bainhas de mielina e, também, digitalizados em sua totalidade em aumento de 200x (câmera digital Axion Vision C5 acoplada a microscópio óptico Zeiss) e submetidos à histomorfometria automática (ZEN 2012<sup>®</sup>, Zeiss) (Figura 3). A quantificação da área mielinizada foi obtida em micrometros quadrados e, a partir deste valores, foi realizada regra de três para obtenção da porcentagem de área remielinizada, considerando as amostras saudáveis como 100% de mielinização. Os resultados obtidos e expressos como área mielinizada (em micrometros quadrados).

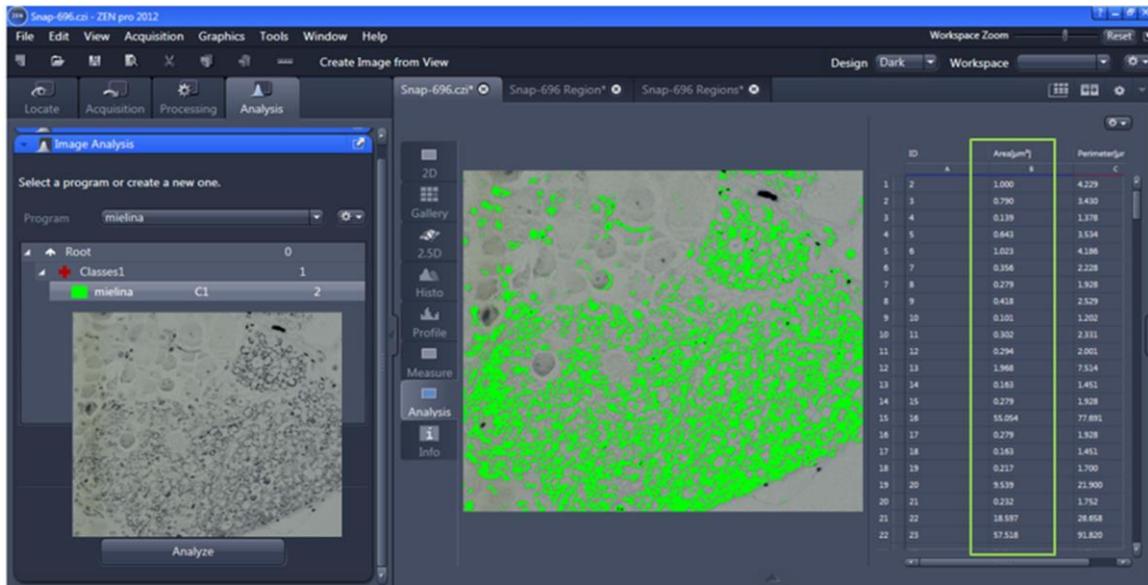


Figura 3. Representação da interface do programa Zen 2012® Zeiss, demonstrando a histomorfometria semi-automática em corte do SNC para quantificação da mielina. Fonte: autor.

### 5.12.3 Avaliação imunoistoquímica

Para avaliação da expressão in situ de IL-17, os cortes foram digitalizadas no mesmo equipamento, mesmo aumento e nas mesmas regiões citadas no ítem 5.12.1.

Foram consideradas positivas aquelas células que exibiram coloração acastanhada intracitoplasmática e, das quais, foi possível a identificação de seu contorno morfológico na região nuclear, dada a grande densidade de prolongamentos citoplasmáticos que constituem normalmente o neurópilo do SNC.

A quantificação foi realizada por histomorfometria semi-automática (Zen 2012®, Zeiss) (Figura 4) e os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas para expressão de IL-17.

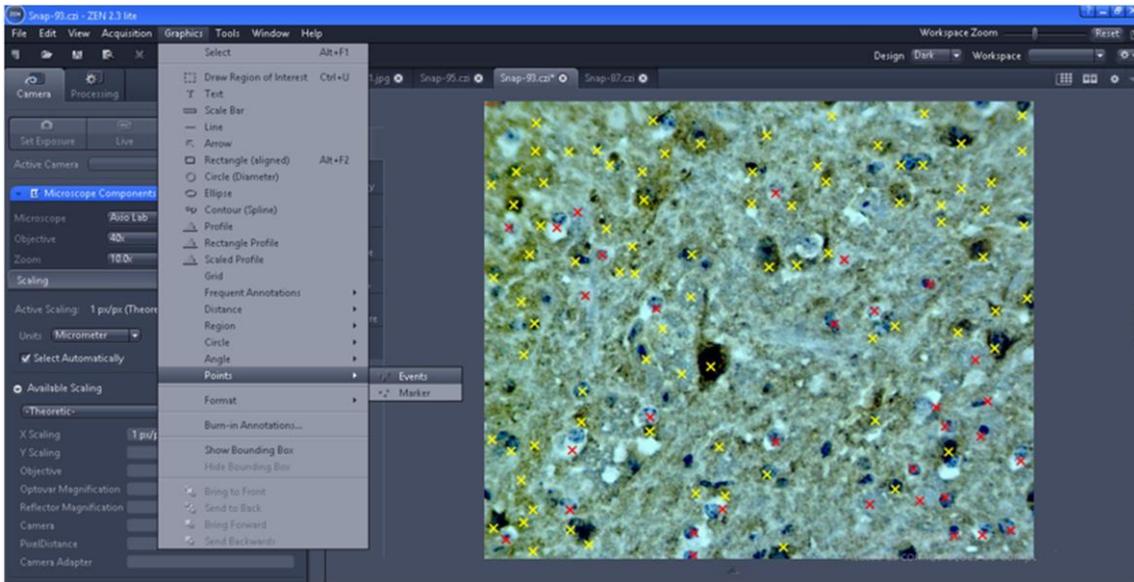


Figura 4. Representação da interface do programa Zen 2012® Zeiss, demonstrando a histomorfometria automática das células positivas para expressão de IL-17 (eventos marcados em amarelo). Os eventos marcados em vermelho foram considerados negativos e utilizados para obtenção da porcentagem de células por campo. Fonte: autor.

### 5.13. Análise estatística

Dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism Software e expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significantes entre os grupos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey, sendo considerado  $P < 0,05$  como nível de significância diferente.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão são apresentados na forma de artigo, o qual está anexado a seguir (ANEXO 1).

## 7. CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos permite concluir que o tratamento oral com ácido caurenico, nas doses de 50 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia, é capaz de melhorar os sintomas clínicos, de reduzir o infiltrado inflamatório e a demielinização no SNC, de diminuir os níveis de NO e das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17, assim como de diminuir a expressão tecidual de IL-17 em camundongos C57BL/6 induzidos com EAE.

Os resultados apresentados neste estudo evidenciam efeitos promissores do ácido caurenico frente a doenças inflamatórias e desmielinizantes do SNC, especialmente para a EAE. Contudo, estudos adicionais devem ser realizados a fim de investigar os mecanismos de ação imunomoduladora e antiinflamatória observados neste estudo.

## 8. REFERÊNCIAS

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

ABEM – Associação Brasileira de Esclerose Múltipla. Disponível em: <<http://www.abem.org.br/>>. Accessed em: 28/04/2019

AMBROSIO, S. R.; TIRAPELI, C.R.; COUTINHO, S.T.; OLIVIERA, D.C.; OLIVEIRA, A.M.; DA COSTA, F.B. Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, n. 11, p. 1407-1413, 2004.

AMBROSIO, S. R.; TIRAPELI, C.R.; DA COSTA, F.B; OLIVEIRA, A.M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. *Life Sciences*, v. 79, n. 10, p. 925-933, 2006.

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

BATISTA, R.; GARCIA, P.A.; CASTRO, M.A.; MIGUEL DEL CORRAL, J.M.; SPEZIALI, N.L.; VAROTTI, F.; PAULA, R.C.; GARCIA-FERNANDEZ, L.F.; FRANCESCH, A.; SAN FELICIANO, A.; OLIVEIRA, A.B. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 168-176, 2013.

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

BEHMER OA. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. 2. ed. Manole: Barueri; 2003.

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

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

BJELOBABA, I; BEGOVIC-KUPRESANIN, V.; PEKOVIC, V.; LAVRNJA, I.  
Animals models of multiple sclerosis: focus on experimental autoimmune  
encephalomyelitis. *Journal Neuroscience Research*, v. 96, p. 1021-1042, 2018.

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

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

CARVALHO, L.S.A.; FONTES, L.B.A.; GAZOLLA, M.C.; DIAS, D.S.; JULIANO,  
M.A.; MACEDO, G.C.; CORREA, J.O.A.; DA SILVA FILHO, A.A. Parthenolide  
modulates immune response in cells from C57BL/6 mice induced with  
experimental autoimmune encephalomyelitis. *Planta Medica*, v. 83, p. 693-700,  
2017.

CHAVAN, M. J. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of Kaur-16-en-19-  
oic acid from *Annona reticulata* L. Bark. *Phytotherapy Research*, v. 26, n. 2, p. 273-  
276, 2012.

CHEN, H.; LUO, B.; XIONG, J.; LIU, Z.; JIANG, M.; SHI, R.; YAN, C.; WU, Y.;  
ZHANG, Z. Therapeutic effects of nonerythropoietin erythropoietin analog  
ARA290 in experimental autoimmune encephalomyelitis rat. *Journal of  
Neuroimmunology*, v.268, p.64-70, 2014.

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

CHENG, Y.; SUN, L.; XIE, Z.; FAN, X.; CAO, Q.; HAN, J.; ZHU, J.; JIN, T.  
Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model:  
pathological and therapeutic implications. *Journal Neuroscience Research*, v.  
95, p. 1973-1983, 2017.

CHIBA, K.; ADACHI, K. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 as a useful target  
for treatment of multiple sclerosis. *Pharmaceuticals*, v. 5, p. 514-28; 2012.

CHOI, R. J.; SHIN, E.M.; JUNG, H.A.; CHOI, J.S.; KIM, Y.S. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Phytomedicine*, v. 18, n. 8-9, p. 677-682, 2011.

CHU, F.; SHI, M.; ZHENG, C.; SHWN, D.; ZHU, J.; ZHENG, X.; CUI, L. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, v. 318, p. 1-7, 2018.

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

CONSTANTINESCU, C.S.; FAROOQI, N.; O'BRIEN K.; GRAN, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology*, v.164, p.1079–1106, 2011.

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

CROXFORD, A. L., KURSCHUS, F. C., WAISMAN, A. Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 182, n.3, p. 1237-41. 2010.

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

DAMY, S.B.; CAMARGO, R.S.; CHAMMAS, R.; De FIGUEIREDO, L.F.P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. *Revista da Associação Medica Brasileira*, v. 56, p. 103-11, 2010.

DAY, M. Histopathology of EAE. *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. L. E and C. C. Springer: New York. 2005, p. 25–43.

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

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

DENIC, A.; JOHNSON, A.J.; BIEBER, A.J.; WARRINGTON, A.E.; RODRIGUEZ, M; PIRKO, I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, v.18, n.1, p.21-9, 2010.

DIAS, D.S.; FONTES, L.B.A.; CROTTI, A.E.M.; AARESTRUP, B.J.V.; AARESTRUP, F.M.; DA SILVA FILHO, A.A.; CORRÊA, J.O.A. Copaiba Oil Suppresses Inflammatory Cytokines in Splenocytes of C57BL/6 Mice Induced with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). *Molecules*, v. 19, p.12814-12826, 2014.

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

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

DOS SANTOS, A.O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; VEIGA JR, V.F.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 59-64, 2013.

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

FAROOQI, N.; GRAN, B.; CONSTANTINESCU, C.S. Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *Journal of Neurochemistry*, v.115, p.:829–844, 2010.

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

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

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

FONTES, L.B.A.; DIAS, D.S.; AARESTRUP, B.J.V.; AARESTRUP, F.M.; DA SILVA FILHO, A.A.; CORREA, J.O.A. Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 91, p. 257-264, 2017.

GARMAN, R.H. Histology of the central nervous system. *Toxicologic pathology*, V. 39(1), P.22-35, 2011.

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

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

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

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

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA JF, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, n.7, p. 2994-3001, 2012

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

KEBIR, H.; KREYMBORG, K.; IFERGAN, I.; DODELET-DEVILLERS, A.; CAYROL, R.; BERNARD, M.;GIULIANI, F.; ARBOUR, N.; BECHER, B.; PRAT, A. Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine*, v.13, n.10, p.1173-75, 2007.

KIM, K.H.; HAN, J.W.; JUNG, S.K.; PARK, B.J.; HAN, C.W. Kaurenoic acid activates TGF- $\beta$  signaling. *Phytomedicine*, v.32, p.8-14, 2017.

KIM, K.H.; SADIKOT, R.T.; JOO, M. Therapeutic effect of ent-kaur-16-en-19-oic acid on neutrophilic lung inflammation and sepsis is mediated by Nrf2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 474, p. 534-540, 2016.

KIPP, M.; NYAMOVA, S.; HOCHSTRASSER, T.; AMOR, S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathology*, v. 27, p. 123-137, 2017.

LAJTHA, A.; GALOYAN, A.; BESEDOVSKY, H. Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Neuroimmunology, Springer Science & Business Media. v.12, 2007.

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

LASSMANN H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models. *Experimental Neurology*,v. 225, p. 2–8, 2010.

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

LEE, P.W.; SEVERIN, M.E.; LOVETT-RACKE, A.E. TGF- $\beta$  regulation of encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis. *European Journal of Immunology*, v.47, p. 446-453, 2017.

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

LINKER, R.A; LEE, D.H.; RYAN, S.; VAN DAM, A.M.; CONRAD, R.; BISTA, P.; ZENG, W.; HRONOWSKY, X.; BUKO, A.; CHOLLATE, S. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. v.34, p.678-692, 2010.

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

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

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

MACRI, J.A.; SILVA, S.S.; MIRANDA, M.M.; KAWAKAMI, N.Y.; NIXDORF, S.L.; ACQUARO jr, V.R.; AMBROSIO, S.R.; VERRI, W.A.; CECCHINI, R.; COSTA, I.C.; ARAKAWA, N.S.; PAVANELLI, W.R. Immunomodulatory and Antioxidant Properties of Kaurenoic Acid on Macrophages of BALB/c in Vitro. *American Journal of Immunology*, v. 10, p. 183-188, 2014.

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

MCGINLEY, A.M.; EDWARDS, S.C.; RAVERDEAU, M.; MILLS, K.H.G. Th17 cells, T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity*, v. 87, p. 97-108, 2018.

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

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

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

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

MIZOKAMI, S.S.; ARAKAWA, N.S.; AMBROSIO, S.R.; ZARPELON, A.C.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI, W.A. Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: Effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic GMP-protein

kinase GATP-sensitive potassium channel signaling pathway. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 5, p. 896-904, 2012.

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

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

MORRIS, K.; YIANNIKAS, C. Treatment Update in Multiple Sclerosis. *Current Allergy and Asthma Reports*, v.12, p.246–54, 2012.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v.75, p.311–35, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 629–661, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

RAO, V.S.; CUNHA, K.M.A.; SILVEIRA, E.R.; et al. Effects of kaurenoic acid, a bioactive diterpene on embryo implantation and pregnancy outcome in mice. *Current Protocols in Toxicology*. 7: 89-84, 2011.

RIBEIRO, S.B.F.; MAIA, D.F.; RIBEIRO, J.B.; CARDOSO, F.A.G.; SILVA, C. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Arquivo de Neuro-Psiquiatria*, v.69, p.18487, 2011.

ROBERT, H.G. Histology of the Central Nervous System. *Toxicologic Pathology*. v. 39, p. 22-35, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VALLI, M., PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; FURLAN, M.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.S. Tropical biodiversity: Has it been a potential source of

secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Química Nova*, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

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

VERRI, W.A.; MIZOKAMI, S.S.; ARAKAWA, N.S.; et al. Kaurenoid acid from *Sphagnetcola trilobata* inhibits inflammatory pain: Effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic Gmp-protein Kinase G-ATP-Sensitive potassium channel signaling pathway. *Journal of Natural Products*. 75: 896-904, 2012.

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

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

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

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

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

Submissions Being Processed for Author José Otávio do Amaral Corrêa, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		Amelioration of the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by kaurenoic acid	May 06, 2019	May 06, 2019	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

1 **Amelioration of the development of experimental autoimmune**  
2 **encephalomyelitis in C57BL/6 mice by kaurenoic acid**

3 Lívia Beatriz de Almeida Fontes<sup>a</sup>, Lara Soares Aleixo de Carvalho<sup>b</sup>, Gilson Costa  
4 Macedo<sup>c</sup>, Fernando Monteiro Aarestrup<sup>a</sup>, Ademar Alves da Silva Filho<sup>b</sup>, José Otávio do  
5 Amaral Corrêa<sup>b</sup>, Beatriz Julião Vieira Aarestrup<sup>a,\*</sup>

6

7 <sup>a</sup>Laboratory of Experimental Immunology and Pathology, CBR, Federal University of Juiz  
8 de Fora, R. José Lourenço Kelmer s/n, Campus Universitário, 36036-900 Juiz de Fora,  
9 MG, Brazil

10 <sup>b</sup> Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of  
11 Juiz de Fora, R. José Lourenço Kelmer s/n, Campus Universitário, 36036-900 Juiz de Fora,  
12 MG, Brazil

13 <sup>c</sup> Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of  
14 Juiz de Fora, R. José Lourenço Kelmer s/n, Campus Universitário, 36036-900 Juiz de Fora,  
15 MG, Brazil

16

17 \*Corresponding author: José Otávio do Amaral Corrêa, Molecular and Cellular  
18 Bioactivity Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, R.  
19 José Lourenço Kelmer s/n, Campus Universitário, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil.  
20 Tel: +55 32 2102-3893; fax: +55 32 2102-3802. E-mail address: [joacorrea@gmail.com](mailto:joacorrea@gmail.com)

21

[Joseotavio.correa@farmacia.ufjf.br](mailto:Joseotavio.correa@farmacia.ufjf.br)

22

23

24

25

26 **Abstract:**

27 *Background:* Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most exploited  
28 model for studying multiple sclerosis (MS). Pathogenesis of both MS and EAE is  
29 characterized by an inflammation process related to the unbalance of invasive and  
30 defensive immune responses. Kaurenoic acid (KA) is a natural diterpene that exhibits  
31 many anti-inflammatory properties.

32 *Purpose:* We aimed to investigate the *in vitro* and *in vivo* KA effects on C57BL/6 mice  
33 induced with EAE.

34 *Methods:* Clinical course and cytokines production were investigated in C57BL/6 EAE-  
35 mice. *In vitro* and *in vivo* immunological responses were evaluated by ELISA and by  
36 histopathological and histomorphometry analysis of the CNS sections stained by  
37 hematoxylin and eosin, Weigert-Pal-Russel, and IL-17 immunohistochemistry methods.

38 *Results:* After isolation by chromatographic fractionation from the roots of Yacon  
39 (*Smallanthus sonchifolius*), KA (at 50 and 100  $\mu$ M) showed a noticeable *in vitro*  
40 immunomodulatory effects, inhibiting the production of NO, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6, and  
41 TNF- $\alpha$ . *In vivo*, KA (50 or 100 mg/kg/day) markedly reduced demyelination and the  
42 number of the inflammatory cells into CNS of EAE-treated mice, also suppressing the  
43 production of NO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-6. Immunohistochemical evaluation  
44 showed that KA (50 or 100 mg/kg/day) reduced the expression of IL-17 into the CNS.

45 *Conclusion:* The oral treatment with KA attenuates neurological damages and reduces  
46 both inflammatory cell infiltration and demyelination into the CNS of EAE-mice.

47

48 **Keywords:** Natural products; Kaurenoic acid; diterpenes; experimental autoimmune  
49 encephalomyelitis; multiple sclerosis

50

51 **Abbreviations:** MS, multiple sclerosis; EAE, experimental autoimmune  
52 encephalomyelitis; KA, kaurenoic acid; CNS, central nervous system; MOG<sub>35-55</sub>,  
53 myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide; NO, nitrite oxide; IFN- $\gamma$ , gamma  
54 interferon; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; CN,  
55 negative control group.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

## 76 **1. Introduction**

77 Multiple sclerosis (MS) is a chronic neuroinflammatory disease characterized by  
78 demyelination, glial scar formation and subsequent degeneration of axonal and neuronal  
79 damage (Galuppo et al., 2014; Kipp et al., 2017; Cheng et al., 2017; Bjelobaba et al.,  
80 2018). MS affects up to 2 million people worldwide, mainly women between age 20  
81 and 40, causing neurological disability and high economical and social consequences  
82 (Constantinescu et al., 2011; Bjelobaba et al., 2018).

83 Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most commonly,  
84 useful and exploited model for studying MS, imitating several histopathological aspects  
85 and immunological facets of MS (Constantinescu et al., 2011; Bjelobaba et al., 2018;  
86 McGinley et al., 2018). Pathological features of both MS and EAE have been related to  
87 the unbalance of invasive (Th1 and Th17) and defensive (Th2 and Treg) T cell  
88 responses and include paralysis, demyelination, weight loss, CNS (Central Nervous  
89 System) inflammation and BBB (Blood-Brain Barrier) disruption (Constantinescu et al.,  
90 2011; Cheng et al., 2017). Several studies showed that infiltrating immune cells produce  
91 nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), chemokines and pro-inflammatory  
92 cytokines, such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 that are associated with inflammation and  
93 impaired neural functions (Giocoppo et al., 2015; Cheng et al., 2017; McGinley et al.,  
94 2018). Oxidative stress, with high production of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in CNS is also  
95 pathogenic, leading to neurological damage and neuroinflammation (Giocoppo et al.,  
96 2015; Chu et al., 2018; McGinley et al., 2018). Considering that therapeutic options in  
97 MS are debatable, presenting high cost, limited efficacy and adverse effects, the  
98 development of more effective treatment is of great benefit in MS (Giocoppo et al.,  
99 2015). In this regard, the use of anti-inflammatory and antioxidant compounds could be  
100 useful in the newly treatment of MS and EAE.

101 Kaurenoic acid (KA) is a natural diterpene found in the amazon oleoresins of  
102 *Copaifera* spp (Matos et al., 2018) and in many medicinal plants popularly used to treat  
103 inflammatory diseases, such as *Aralia continentalis* (Lyu et al., 2011; Choi et al., 2011;  
104 Kim et al., 2016), *Wedelia paludosa* (Mizokami et al., 2012) and *Smallanthus*  
105 *sonchifolius* (Matos et al., 2018). Previous studies showed that KA presents potent *in*  
106 *vivo* anti-inflammatory properties, being able to reduce carrageenan-induced paw edema  
107 (Choi et al., 2011), TPA-induced ear edema (Diaz-Viciedo et al., 2008; Zhang et al.,  
108 2017) and acetic acid-induced colitis in rats (Paiva et al., 2002). Also, KA is able to  
109 inhibit the *in vitro* production of several inflammatory mediators involved in MS and  
110 EAE, such as NO, IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (Diaz-Viciedo et al., 2008; Choi et al.,  
111 2011; Hueso-Falc3n et al., 2011). Then, in this study, we investigated the *in vitro* and *in*  
112 *vivo* effects of KA on EAE.

113

## 114 **2. Material and methods**

### 115 **2.1. Chemicals**

116 Pertussis toxin, horseradish peroxidase type I, MOG<sub>35-55</sub> peptide, RPMI 1640  
117 medium, complete Freund's adjuvant, phorbol myristate acetate, ABTS was purchased  
118 from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Immunohistochemistry and ELISA assay  
119 kits were acquired from PeProtech Inc (Rock Hill, NJ, USA) and Santa Cruz, CA  
120 biosciences. *Mycobacterium tuberculosis* H37RA was from Difco (Detroit, MI, USA).

121

### 122 **2.2. Isolation of kaurenoic acid (KA)**

123 Roots of *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) were collected at the Faculty of  
124 Pharmacy's Medicinal Herb Garden, Juiz de Fora city, MG, Brazil, in July 2013. Dr.  
125 Fernanda Lob3o Gotti (UFV) kindly authenticated the plant material and a voucher

126 specimen of *S. sonchifolius* (41.713) was stored at the Herbarium of the Botany  
127 Department of the Federal University of Viçosa (UFV), MG, Brazil.

128 Roots (1800 g) were dried, powdered, and exhaustively extracted, by  
129 maceration, using  $\text{CHCl}_3$  as solvent. After extraction,  $\text{CHCl}_3$  was removed under  
130 vacuum to yield 24 g of the crude chloroformic extract of the *S. sonchifolius* roots (Ss).  
131 Next, the chloroform extract (Ss, 22 g) was chromatographed over silica gel using a  
132 vacuum liquid chromatography system and hexane: ethyl acetate mixtures in increasing  
133 proportions as eluents, furnishing 9 fractions. The resulting fractions III (2.10 g) and IV  
134 (0.75 g) were joined and submitted to flash chromatography over silica gel, using  
135 hexane: ethyl acetate in increasing proportions as eluent, affording kaurenoic acid (KA,  
136 600 mg).

137

### 138 **2.3. HPLC-DAD analysis of KA**

139 The isolated KA was analyzed using HPLC chromatograph equipped with DAD  
140 detector (Waters 2998), autosampler (Waters 2707), binary HPLC pump (Waters 1525).  
141 The analytical column used was a SunFire  $\text{C}_{18}$  column (5  $\mu\text{m}$  particle size, 4.6 mm  $\times$   
142 250 mm) with a SunFire  $\text{C}_{18}$  precolumn (5  $\mu\text{m}$  particle size, 4.6 mm  $\times$  20 mm), both  
143 from Waters. The mobile phase was a mixture of ultrapure water acidified with 0.5% of  
144 phosphoric acid (A) and acetonitrile (B). The gradient method was as follows: 40–100%  
145 (B) in 0-30 min. The flow rate of mobile phase was 1 mL/min. KA was diluted in  
146 methanol (HPLC grade) to reach a final concentration of 2 mg/mL. Solution was  
147 filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filters and degassed before usage. The injection  
148 volume was 15  $\mu\text{L}$ .

149

### 150 **2.4. Ethics statement**

151 This study was carried out in accordance with Brazilian Legislation. The  
152 experimental design was approved by the Ethical Committee for Animal Care of the  
153 Federal University of Juiz de Fora (Protocol CEUA n°. 029/2013). Animals were  
154 obtained from the animal care facilities at the Federal University of Juiz de Fora  
155 (Reproductive Biology Center/UFJF) and housed under standardized light and climate-  
156 controlled conditions and maintained in micro isolator cages with free access to food  
157 and water.

158

### 159 ***2.5. In vitro viability***

160 Splenocytes obtained from EAE-mice were treated with KA (50, 100, and 200  
161  $\mu\text{M}$ ) and evaluated in cell viability using MTT assay, as previously described (Carvalho  
162 et al., 2017). Cells were plated at a density of  $5 \times 10^4$  per well in a 96-well plate and  
163 incubated at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. After incubation,  
164 aliquots of 250  $\mu\text{L}$  of MTT (5 mg/mL in RPMI) were added to well and the 96-well  
165 plates were incubated at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> for another 3 h.  
166 After washing three times with PBS buffer, DMSO (100  $\mu\text{L}$ ) was added to each well  
167 and the absorbance measured at 570 nm on a plate reader (TP Reader NM;  
168 Thermoplate).

169

### 170 ***2.6. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)***

171 After anesthesia, female C57BL/6 mice (8-12 weeks old; 20-23g) were  
172 immunized subcutaneously, at the tail base, with 100 $\mu\text{L}$  of the emulsion composed by  
173 100  $\mu\text{g}$  of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG<sub>35-55</sub>) in complete  
174 Freund's adjuvant (CFA) (v/v), supplemented with 400 $\mu\text{g}$  heat-killed *M. tuberculosis*

175 H37RA. After, animals were immunized with pertussis toxin (300 ng/animal/i.p.),  
176 which was repeated 48h later (Fontes et al., 2014; Fontes et al., 2017).

177

### 178 ***2.7. In vitro treatment with KA in cell culture***

179 On the day 20 after induction of EAE (peak of the disease), mice were  
180 euthanized under deepening anesthesia (i.p.). Fresh splenocytes were obtained by  
181 teasing the spleens under aseptic conditions, and single-cell suspensions were prepared  
182 using standard procedures (Carvalho et al., 2017). Erythrocytes were removed by  
183 osmotic lysis. Splenocytes were counted in a haemocytometer to obtain a final  
184 concentration of  $1 \times 10^6$ /mL and seeded on round-bottom 96 well plate (100 uL/well).  
185 After, all obtained cells were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 5%  
186 heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100  
187  $\mu$ g/mL streptomycin, in a humidified incubator, at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells  
188 were incubated in the presence or absence of MOG<sub>35-55</sub> peptide (10  $\mu$ g/mL).  
189 Simultaneously at MOG<sub>35-55</sub> stimulation, cells were treated with non-cytotoxic  
190 concentrations of KA (50 and 100  $\mu$ M). The EAE group (immunized cells) was used as  
191 positive control, while the negative control group, whose cells were obtained from non-  
192 immunized mice, received a similar volume of vehicle (PBS). After *in vitro* treatment  
193 with KA, supernatants were collected, and NO and cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6, and  
194 TNF- $\alpha$ ) were measured.

195

### 196 ***2.8. In vivo experimental protocol***

197 Immunized mice were randomly divided into the following groups (n = 5): EAE  
198 group: mice subjected with EAE that received no treatment; Negative control group  
199 (NC): non-immunized mice that received only vehicle (5% tween 80 in PBS); KA

200 groups, in which EAE-mice were orally treated with KA at the doses of 50 mg/kg/day  
201 (KA 50 group) or 100 mg/kg/day (KA 100 group). All treatments were performed daily,  
202 per gavage, for 7 days, after the onset of disease signs (around 13 days after  
203 immunization). After the end of experiment, on the day 20 after induction (peak of the  
204 disease), mice were euthanized under deepening anesthesia (i.p.), and tissues and cells  
205 were sampled and processed in order to evaluate parameters of disease.

206

### 207 ***2.9. Clinical score***

208 Mice were observed daily for signs of EAE up to 20 days after immunization.  
209 Disease severity and neurological impairment was evaluated on a standardized clinical  
210 scale of 0 to 5 as follow: 0, no disease; 1, limp tail; 2, hind limb weakness; 3, hind limb  
211 paralysis; 4, hind and forelimb paralysis; and 5, moribund state (Peron et al., 2010).  
212 Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of all animals for each experimental group.

213

### 214 ***2.10. Nitric oxide (NO) levels***

215 NO production was measured in supernatants of splenocytes after 48h OF  
216 incubation, according to Griess method (Green et al., 1982), which assesses  
217 accumulation of nitrite. The nitrite concentration was calculated using sodium nitrite as  
218 standard (Carvalho et al., 2017).

219

### 220 ***2.11. Determination of cytokines levels***

221 Cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-6, and IFN- $\gamma$ ) production was determined in  
222 supernatants of splenocytes by ELISA using commercial kits, according to the  
223 manufacturer's instructions and previous works (Fontes et al., 2014; Carvalho et al.,  
224 2017; Fontes et al., 2017). Plates were read at 405 nm with spectrophotometer (TP

225 Reader NM microplate reader), while the levels of sensitivity were 16 pg/mL (according  
226 to the manufacturer's information).

227

### 228 ***2.12. Histological and immunohistochemistry processing of CNS samples***

229 After sedation and euthanasia, samples of CNS (brain, cerebellum and spinal  
230 cord) were cleaved and fixed for 48h in 4% (w/v) PBS-buffered formaldehyde. After  
231 fixation, samples were dehydrated, clarified, and embedded in paraffin. Afterward,  
232 samples were sectioned in a microtome (Spencer 820) into sections of 5 µm thickness  
233 and prepared to perform routine staining by hematoxylin and eosin (HE) to assess  
234 inflammatory damages (Fontes et al., 2017). Also, in order to show myelin organization  
235 in histological sections of CNS, samples was stained with the Weigert-Pal-Russel  
236 histochemical staining, which selectively stains myelin sheaths in dark gray (Nagato et  
237 al., 2015). In addition, immunohistochemistry for detection of *in situ* expression of IL-  
238 17 (polyclonal anti-IL17 antibody 1:100, Santa Cruz Biotechnology) was performed  
239 using the avidin-biotin peroxidase antiperoxidase method (Nagato et al., 2015).

240

### 241 ***2.13. Histopathological and histomorphometry analysis***

242 All histological sections of the CNS samples were analyzed by optical  
243 microscopy (Carl Zeiss, Hallbergmoos, Germany, 400x magnification) in a double blind  
244 study by two different specialists, in which specific anatomical areas were selected for  
245 capture and scanning (Axiovision system, Zeiss, version 4.8) and for descriptive  
246 histopathological evaluation, according to methodology described (Nagato et al., 2015;  
247 Fontes et al., 2017).

248 In HE stained section, the inflammatory areas of CNS samples were submitted to  
249 semi-automatic histomorphometry analysis in order to quantify inflammation

250 (leukocytes per microscopic field by x400 magnification) (Nagato et al., 2015; Fontes et  
251 al., 2017). Histomorphometric data were expressed as mean of the total number of  
252 inflammatory cells and standard deviation (mean  $\pm$  SD) in the CNS.

253 In histochemical sections stained with the Weigert-Pal-Russel staining,  
254 myelinated areas were obtained by semi-automatic histomorphometry using an image  
255 capture system (Zeiss Zen2012 Software). Results were expressed as the mean of the  
256 total myelinated area ( $\mu\text{m}^2$ ) and standard deviation (mean  $\pm$  SD) in the CNS (Nagato et  
257 al., 2015).

258 In samples submitted to IL-17 immunohistochemistry, cells with brown color  
259 staining in cytoplasm were considered as positive for IL-17 expression. Then, the semi-  
260 automatic histomorphometry (Image Zeiss Zen2012 Software) was used to quantify the  
261 positive cells and calculated their percentage per microscopic field (by x400  
262 magnification). The results were expressed as mean of the percentage of positive IL-17  
263 cells  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD) into the CNS (Nagato et al., 2015).

264

#### 265 **2.14. Statistical analysis**

266 Statistical tests were performed with Graphpad Prism software. Significant  
267 differences were determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) and by  
268 applying Tukey test for multiple comparisons with the level of significance set at P <  
269 0.05.

270

### 271 **3. Results**

#### 272 **3.1. Isolation and HPLC-DAD chromatographic analysis of KA**

273 KA (600 mg, **Fig. 1**) was isolated from the roots of *S. sonchifolius* by  
274 chromatographic fractionation and identified by  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data analysis in

275 comparison to literature (Mizokami et al., 2012; Kim et al., 2016). After  $^{13}\text{C}$ -NMR and  
276 HPLC-DAD analysis (**Fig. 1**), purity of KA was estimated to be higher than 95%.

277

### 278 **3.2. Cytotoxicity**

279 After isolation, the influence of KA on splenocyte viability was evaluated by  
280 MTT assay. Our findings showed that, at 50 and 100  $\mu\text{M}$ , KA presented low toxicity to  
281 splenocytes, showing 97% and 85% of viability, respectively. However, a significant  
282 reduction on cell viability (20% of viability) was noted at 200  $\mu\text{M}$  of KA (**Table 1**).

283

### 284 **3.3. Inhibition of NO and cytokines after in vitro treatment with KA**

285 We assessed the *in vitro* effects of KA (at 50 and 100  $\mu\text{M}$ ) on cytokines (TNF- $\alpha$ ,  
286 IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-17) and NO production by splenocytes from EAE-induced C57BL/6  
287 mice. KA was able to inhibit the production of NO in 34.5% (at 50  $\mu\text{M}$ ) and 67.1% (at  
288 100  $\mu\text{M}$ ) in comparison with MOG-stimulated cells from EAE group, which produced  
289 high levels of NO. Regarding cytokines production, KA (at 100  $\mu\text{M}$ ) reduced the levels  
290 of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-17 in 59.3%, 58.7%, 59.8%, and 56.0%, respectively  
291 (**Table 1**).

292

### 293 **3.4. Clinical score after in vivo treatment with KA**

294 After immunization of C57BL/6 mice with MOG<sub>35-55</sub>, animals were randomized  
295 and, after beginning of symptoms, treated with KA (50 or 100 mg/kg/day) or vehicle up  
296 to 20 days post the initial treatment. Clinical signs were evaluated daily, using a  
297 standardized scoring system (Peron et al., 2010). Mice subjected to EAE induction  
298 developed the first symptoms of disease around 12-days after immunization by  
299 displaying loss of tail tonus, weakness of limbs, and body weight loss. On the day 19

300 (peak of the disease), EAE-mice showed a clinical score as mean  $3.0 \pm 0.2$  (**Fig. 2**). On  
301 the contrary, EAE-mice treated daily with KA exhibited slight signs of disease, with  
302 clinical scores as mean  $0.4 \pm 0.1$  (KA 50 mg/kg/day) and  $0.6 \pm 0.1$  (KA 100  
303 mg/kg/day) (**Fig. 2**).

304

### 305 ***3.5. KA treatment improved histopathology of EAE***

306 After, to assess the *in vivo* effects of KA on neuroinflammation in EAE-mice,  
307 sections of CNS (brain, cerebellum and spinal cord) were stained with hematoxylin and  
308 eosin (**Fig. 3**). H&E staining for EAE group (**Fig. 3B**) displayed a notable damage, with  
309 a wide area of inflammation and a significant mononuclear cell infiltration in  
310 comparison with control group (**Fig. 3A**), which showed normal histological  
311 appearance. On the other hand, in the EAE-mice treated with both doses of KA (**Figs.**  
312 **3C and D**), histological inflammatory areas were significantly decreased compared with  
313 EAE group. Additionally, histomorphometry analysis of the total inflammatory cells in  
314 the CNS showed that after *in vivo* treatment with KA, at 50 and 100 mg/kg/day, the  
315 inflammatory infiltrate in the CNS of EAE-mice were inhibited in 69.7% and 60.1%,  
316 respectively, in comparison with EAE group (**Fig. 3E**).

317

### 318 ***3.6. KA treatment reduces demyelination in CNS***

319 In order to evaluate myelination, the Weigert-Pal-Russel staining was used  
320 (**Fig. 4**). Compared to control mice (**Fig. 4A**), EAE-untreated mice (**Fig. 4B**) exhibited  
321 noticeable reduced myelin and axonal structures in the spinal cord. In contrast,  
322 significant protection against EAE was observed in EAE-mice treated with KA at both  
323 doses (**Fig. 4C and 4D**), where reduced demyelination and axonal loss were detected.  
324 Quantification of myelin area into CNS by histomorphometry analysis also revealed that

325 KA treatment markedly reduced demyelination (**Fig. 4E**), while in the EAE-mice the  
326 myelinated area into the CNS was significantly decreased (**Fig. 4E**) in about 70% in  
327 comparison with control group.

328

### 329 *3.7. KA reduces NO and cytokines production in EAE-mice*

330 As expected, the analysis of the pro-inflammatory mediators showed that  
331 splenocytes from EAE-mice (EAE group) present an elevated production of pro-  
332 inflammatory mediators (NO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-17) (**Fig. 5**). However, the  
333 KA treatment completely changes this situation. As showed in figure 5A, KA treatment,  
334 at both used concentrations, inhibited significantly the production of NO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ,  
335 IL-6 and IL-17. In comparison with EAE group, the maximal reduction of NO, TNF- $\alpha$ ,  
336 IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-17 induced by KA was around 75.0%, 75.9%, 78.6%, 64.9% and  
337 57.7%, respectively (**Fig. 5**).

338

### 339 *3.8. KA modulates the expression of IL-17*

340 To test whether treatment of EAE-mice with KA modulates the expression of  
341 IL-17, we analyzed the CNS by immunohistochemical analysis (**Fig. 6**). A reduced  
342 positive staining cells for IL-17 expression was obtained in both KA-treated groups  
343 (**Fig. 6C and D**), which percentages of positive cells were similar to the control group  
344 (**Fig. 6A**). On the contrary, quantification by histomorphometry analysis showed high  
345 percentage of positive cells for IL-17 expression into CNS of EAE-mice (**Fig. 6E**).

346

## 347 **4. Discussion**

348 Recently studies directing to the search for anti-inflammatory natural  
349 compounds with beneficial effects on EAE and MS has intensified (Fontes et al., 2017;

350 Yang et al., 2017; Kamisli et al., 2018; Li et al., 2018; Mahamoodi et al., 2019). Among  
351 natural compounds, some terpenes, such as celastrol (Yang et al., 2017), glycyrrhetic  
352 acid (Kamisli et al., 2018), carnosol (Li et al., 2018), carvacrol (Mahamoodi et al.,  
353 2019), parthenolide (Carvalho et al., 2017), and  $\beta$ -caryophyllene (Fontes et al., 2017)  
354 have shown promising *in vitro* and *in vivo* effects on EAE model. KA is a natural  
355 diterpene known for its anti-inflammatory effects (Kim et al., 2016; Zhang et al., 2017),  
356 as well as for its ability to inhibit important inflammatory markers involved in the  
357 immunopathogenesis of EAE and MS (Diaz-Viciedo et al., 2008; Choi et al., 2011;  
358 Hueso-Falc3n et al., 2011). Based on that, in the present study, we investigated the *in*  
359 *vitro* and *in vivo* effects of KA on C57BL/6 EAE-mice. For the first time, we provided  
360 evidence for the potential of KA in attenuation of inflammation and neurological  
361 damages in CNS of EAE-mice.

362 First, KA was obtained from the *S. sonchifolius* roots by chromatographic  
363 fractionation. Afterward, cytotoxicity was evaluated in MTT assay, showing that KA  
364 was not toxic to splenocytes at 50 or 100  $\mu$ M, giving support to further *in vitro*  
365 preliminary immunomodulatory assays. Our viability findings are in agreement with  
366 previous *in vitro* works (Choi et al., 2011), which also showed that KA was not  
367 cytotoxic to macrophages RAW 264.7 and other cells with concentrations up to 100  
368  $\mu$ M.

369 Next, we investigated the *in vitro* effects of KA on splenocytes from C57BL/6  
370 EAE-mice. Previous studies have already shown that KA is able to inhibit the *in vitro*  
371 production of NO and TNF- $\alpha$  in mouse RAW 2647 macrophages (Diaz-Viciedo et al.,  
372 2008; Choi et al., 2011; Hueso-Falc3n et al., 2011), with an  $IC_{50}$  about of 107  $\mu$ M  
373 (Choi et al., 2011). Then, we hypothesized that, in splenocytes from EAE-mice, KA  
374 could also decrease NO and cytokines levels after *in vitro* treatment. As we supposed,

375 KA also showed noticeable *in vitro* immunomodulatory effects on production of NO  
376 and pro-inflammatory cytokines involved in MS, which encourage us to further analyze  
377 the *in vivo* effects of KA on C57BL/6 EAE-mice.

378 In this regard, C57BL/6 mice were immunized with MOG<sub>35-55</sub> in CFA plus  
379 pertussis toxin, and after EAE induction and *in vivo* treatment, we found that KA  
380 improves clinical score caused by EAE.

381 EAE model is a well-documented and the most commonly *in vivo* model to  
382 study MS, reproducing similar clinical features, such as paralysis and body weight loss  
383 (Kipp et al., 2017; Bjelobaba et al., 2018), which are typical signs correlated with  
384 severity of the disease (Giocoppo et al., 2015). In our study, the treatment of EAE-  
385 induced mice with KA at both doses (50 or 100mg/kg/day) prevents the increase of  
386 clinical scores. As in EAE model, the improvement of clinical score may be correlated  
387 with the reduction of neurological damages and disability in MS human patients  
388 (Giocoppo et al., 2015), our results indicate that the *in vivo* treatment with KA may  
389 ameliorate the severity of EAE.

390 After, to assess the effects of KA on neuroinflammation in EAE-mice, sections  
391 of CNS were stained with hematoxylin and eosin and the total number of inflammatory  
392 cells were quantified by histomorphometry. While in the CNS of EAE-mice a large  
393 amount of inflammatory cells was observed, in the KA-treated mice (at both doses) a  
394 reduced number of inflammatory cells was detected.

395 As EAE is a demyelinating disease (Bjelobaba et al., 2018), myelinated areas  
396 into CNS, sheath integrity and organization were assessed by the Weigert-Pal-Russel  
397 staining. EAE-mice exhibited significantly reduced myelinated area, while EAE-mice  
398 treated with KA showed similar areas of myelination in comparison with negative  
399 control. In EAE model, demyelinating lesions occurs after secretion of pro-

400 inflammatory cytokines and chemokines by T cells, resulting in activation of  
401 macrophages and microglia (Constantinescu et al., 2011; Bjelobaba et al., 2018;  
402 McGinley et al., 2018). After activation, microglia and macrophages release cytotoxic  
403 mediators, such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , NO, and ROS, which may cause tissue injury (Chu et  
404 al., 2018). After, a neuroinflammatory response occurs, resulting in myelin and axonal  
405 damage, leading to pathology and clinical signs, such as paralysis (McGinley et al.,  
406 2018).

407         Then, consistent with the reduced clinical scores, histopathological  
408 investigations showed that KA treatment markedly attenuated inflammatory cell  
409 infiltration and reduced demyelination into CNS of EAE-mice.

410         Additionally, rise of pro-inflammatory cytokines has been correlated with  
411 several neurodegenerative pathologies, including MS (Giocoppo et al., 2015). Th1 and  
412 Th17 cells mediate essential functions in the neuronal demyelination and the  
413 immunopathogenesis of MS and EAE (Mahamoodi et al., 2019). After stimulation, Th1  
414 cells produced mainly TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , which are largely responsible for the induction  
415 of the inflammatory process in CNS (Cheng et al., 2017; McGinley et al., 2018).  
416 Instead, activated Th17 cells and its major cytokine IL-17 are involved in MS-related  
417 neurological severity, pathological process, and in the exacerbation of the inflammatory  
418 responses, mainly due to increase of BBB rupture, facilitating the infiltration of  
419 inflammatory cells into the CNS (Leiper, Nandi, 2011; Chu et al., 2018; McGinley et  
420 al., 2018).

421         To investigate modulation on inflammatory Th1 cytokines in EAE-mice  
422 treated with KA, we first examined the production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  on EAE-mice.  
423 Our findings showed that after the *in vivo* treatment with KA, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were  
424 inhibited. Previous studies showed that KA significantly suppressed the *in vitro*

425 production of pro-inflammatory mediators, including TNF- $\alpha$  (Choi et al., 2011) and  
426 IFN- $\gamma$  (Hueso-Falc3n et al., 2011). Additionally, in a mouse model of inflammation, the  
427 oral treatment of KA inhibited TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production (Mizokami et al., 2012).  
428 IFN- $\gamma$  is related to the differentiation of Th1 cells and activation of macrophages, as  
429 well in the in BBB permeability, playing a significant role in the demyelination and  
430 inflammatory process into CNS tissues of MS and EAE (Constantinescu et al., 2011). In  
431 addition, high levels of IFN- $\gamma$  cause potent activation of macrophages and other immune  
432 cells, which produce high levels of NO (Choi et al., 2011).

433 In this regard, we also evaluated the NO production in EAE-mice treated with  
434 KA. The results indicated lower production of NO showed in KA-treated EAE-mice.  
435 Our findings are in agreement of previous results (Choi et al., 2011), which  
436 demonstrated the inhibition of NO production in LPS-stimulated RAW 264.7  
437 macrophages by KA. NO is cytotoxic and cytostatic, being also responsible for axonal  
438 damage and injury to the myelin sheath (Leiper et al., 2011).

439 Afterward, considering that KA could be also effective in reducing inflammatory  
440 cytokines, we evaluated its effects on IL-17 and IL-6 production. Several studies have  
441 shown that IL-17, produced by Th17 cells, play a pivotal role in inflammatory cell  
442 infiltration and demyelination in autoimmune diseases, such as MS and EAE (Higashi et  
443 al., 2017; McGinley et al., 2018). Patients with MS have a higher level of IL-7, which is  
444 also exerts direct cytotoxic activity, causing death of neuronal cells in MS (Cheng et al.,  
445 2017; McGinley et al., 2018). In addition to the role of IL-17 in MS pathology, studies  
446 showed that IL-6 deficient mice are resistant to EAE induction (Gijbels et al., 1995;  
447 Mahamoodi et al., 2019) and that neutralization of IL-6 has a protective effect on EAE  
448 (Constantinescu et al., 2011; Mahamoodi et al., 2019). Our results showed that lower  
449 levels of IL-17 and IL-6 were found in KA-treated mice, showing for the first time that

450 the *in vivo* treatment with KA inhibits their production in EAE-induced C57BL/6 mice.  
451 Since the IL-6 is involved in differentiation of naïve CD4<sup>+</sup> lymphocytes to Th17 profile  
452 (Mahamoodi et al., 2019), decrease of IL-6 production induced for KA may be  
453 associated with the lower levels of IL-17.

454 In this regard, we also investigated the expression of IL-17 by  
455 immunohistochemical staining in CNS of EAE-mice. By immunohistochemical staining  
456 we found that *in vivo* treatment with KA reduced the percentage of positive IL-17  
457 staining in CNS of EAE-mice. Therapeutic targeting of IL-17 production has become  
458 one of a major focus for the development of anti-inflammatory drugs in the  
459 pharmaceutical industry (McGinley et al., 2018). Studies have shown that blocking IL-  
460 17 may reduce lesion activity in EAE model and be effective in treating several MS  
461 patients (Cheng et al., 2017; McGinley et al., 2018).

462 In this study, the effects of KA on decreasing the production of IFN- $\gamma$ , IL-6 and  
463 IL-17 may be performed in part through modulating Th1 and Th2 cells. Besides, in both  
464 MS and EAE, demyelination, axonal damage and tissue injury are related to reactive  
465 oxygen species, such as NO, as well as to cytotoxic mediators (Fletcher et al., 2010;  
466 Rodgers et al., 2012). Then, KA treatment may also reduce inflammation and  
467 demyelination into CNS, at least, by reducing the inflammatory cytokines such as TNF-  
468  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , involved in tissue damage.

469 First studies suggested that the anti-inflammatory mechanisms of KA are related  
470 to the suppression of NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) activation (Choi et al., 2011).  
471 However, it was shown that KA failed to suppress gene expression of some pro-  
472 inflammatory mediators, such as NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12, suggesting that KA  
473 may not have impact on activation of NF- $\kappa$ B (Lyu et al., 2011). Currently, it was shown  
474 that KA is an effective activator of the of the nuclear factor erythroid 2- related factor 2

475 (Nrf2) (Lyu et al., 2011; Kim et al., 2016). In response to oxidative stress, Nrf2  
476 regulates several protective antioxidant mechanisms in CNS (Lyu et al., 2011; Kim et  
477 al., 2016). Also, as a redox factor, Nrf2 induces the expression of many genes related to  
478 detoxication, as well as to antioxidant enzymes through binding to their antioxidant  
479 response elements (ARE) (Li et al., 2013; Higashi et al., 2017). On the other hand, it has  
480 been demonstrated that Nrf2 is also able to suppress macrophage inflammatory response  
481 by blocking proinflammatory cytokine transcription, mainly IL-1 and IL-6. Thus, Nrf2  
482 seems to be involved in the anti-oxidation and anti-inflammatory pathways (Kobayashi  
483 et al., 2016).

484 On MS, Nrf2 seems to mediate the antioxidant response to oxidative stress  
485 (Higashi et al., 2017), since Nrf2 target genes are upregulated in MS lesions (Van  
486 Horssen et al., 2006). Furthermore, the activation of Nrf2 in mice submitted to EAE  
487 model has been associated to reduction of IL-6 and IL-17 production and improvement  
488 of EAE clinical score (Pareek et al., 2011; Kobayashi et al., 2016). Thus, Nrf2 appears  
489 to be a promising target in MS treatment (Pareek et al., 2011; Higashi et al., 2017). In  
490 this context, some Nrf2 inducers, such as sulphorane and triterpenoid, have been  
491 evaluated on EAE-mice showing important immunomodulatory activity (Pareek et al.,  
492 2011; Li et al., 2013; Higashi et al., 2017).

493 Therefore, since the activation of Nrf-2 may result in improvement of EAE and  
494 in decreasing of pro-inflammatory mediators production (Pareek et al., 2011; Higashi et  
495 al., 2017), as well as that the anti-inflammatory properties of KA may be related to the  
496 Nrf-2 activation (Lyu et al., 2011; Kim et al., 2016), we may suggest that, at least in  
497 part, the modulation of EAE by KA is related to Nrf-2 activation. Despite of this, more  
498 studies are necessary to clear this hypothesis. The KA treatment of Nrf-2-knockout mice  
499 submitted to EAE model could elucidate this point.

500 In a different way, it has been demonstrated that KA is also able to activate the  
501 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway by inducing the phosphorylation of  
502 Smad2 and Smad3, two key proteins on TGF- $\beta$  signaling (Kim et al., 2017). TGF- $\beta$  is a  
503 pleiotropic cytokine with a wide range of functions, mainly on immune responses (Lee  
504 et al., 2017). In the immune system, TGF- $\beta$  is related, among others, with the induction  
505 of tolerance and resolution of inflammatory responses, beside the differentiation of T  
506 cells to regulatory or Th17 profiles (Lee et al., 2017).

507 In EAE, although some studies has associated the increase of EAE severity with  
508 an excessive production of TGF- $\beta$  (Wyss-Coray et al., 1997), several works has showed  
509 a protective effect of this cytokine. Also, studies showed that the enhancement of TGF-  
510  $\beta$  signaling in T cells would be beneficial to ameliorate MS in patients (Lee et al.,  
511 2017). In addition, the neutralization of TGF- $\beta$  by monoclonal antibody enhances the  
512 EAE severity (Johns et al., 1993), while the systemic administration of TGF- $\beta$ 1 (the  
513 predominant isoform expressed in the immune system) prevents or inhibits EAE (Johns  
514 et al., 1991). Furthermore, the recovery of the paralysis, characteristic of the EAE  
515 model (relapsing-remitting), also is dependent of TGF- $\beta$  (Zhang et al., 2006). All these  
516 findings suggest that TGF- $\beta$  has a protective effect on EAE and possibly on MS. On this  
517 scenario, since KA activates TGF- $\beta$  signaling, the decrease of EAE severity induced by  
518 KA also could be related to the activation of TGF- $\beta$  pathway. However, more  
519 experiments have to be performed in order to state if the promising effects of KA on  
520 EAE model are related or not to Nrf-2 or/and TGF- $\beta$  pathways.

521

## 522 **5. Conclusion**

523 Our data indicate for the first time that the oral treatment of EAE-mice  
524 with KA may attenuate the clinical EAE symptoms, reduce inflammatory cell

525 infiltration damage and demyelination into the CNS, as well as decrease the levels of  
526 NO and the pro-inflammatory cytokines IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . This study is  
527 the first pre-clinical evidence that KA ameliorates EAE, representing a starting point for  
528 further investigations in MS and other neuroinflammatory diseases.

529

### 530 **Conflict of interest**

531 The authors declare that there are no conflicts of interest.

### 532 **Acknowledgements**

533 The authors are grateful to FAPEMIG (Grant numbers # APQ 04257/10; APQ  
534 0171/11; APQ 02015/14; PPM-00296-16) and CNPq (Grant number # 487221/2012-5)  
535 for financial support, as well as to CAPES, PIBIC/CNPq/UFJF and CNPq for  
536 fellowships.

537

### 538 **References**

- 539 Bjelobaba, I., Begovic-Kupresanin, V., Pekovic, V., Lavrnja, I., 2018. Animals models  
540 of multiple sclerosis: focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.*  
541 *Neurosci. Res.* 96, 1021-1042.
- 542 Carvalho, L.S.A., Fontes, L.B.A., Gazolla, M.C., Dias, D.S., Juliano, M.A., Macedo,  
543 G.C., Correa, J.O.A., Da Silva Filho, A.A., 2017. Parthenolide modulates immune  
544 response in cells from C57BL/6 mice induced with experimental autoimmune  
545 encephalomyelitis. *Planta Med.* 83, 693-700.
- 546 Cheng, Y., Sun, L., Xie, Z., Fan, X., Cao, Q., Han, J., Zhu, J., Jin, T., 2017. Diversity of  
547 immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: pathological and  
548 therapeutic implications. *J. Neurosci. Res.* 95, 1973-1983.

- 549 Choi, R.J., Shin, E.M., Jung, H.A., Choi, J.S., Kim, Y.S., 2011. Inhibitory effects of  
550 kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS induced inflammatory response  
551 in RAW 264.7 macrophages. *Phytomedicine* 18 (8-9), 677-682.
- 552 Chu, F., Shi, M., Zheng, C., Shwn, D., Zhu, J., Zheng, X., Cui, L., 2018. The roles of  
553 macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune  
554 encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 318, 1-7.
- 555 Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., 2011. Experimental  
556 autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br.*  
557 *J. Pharmacol.* 164, 1079–1106.
- 558 Diaz-Viciedo, R., Hortelano, S., Giron, S.N., Masso, J.M., Rodriguez, B., Villar, A., De  
559 Las Heras, B., 2008. Modulation of inflammatory responses by diterpene acids  
560 from *Helianthus annuus* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 761–766.
- 561 Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., Mills, K.H., 2010. T cells in  
562 multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Exp.*  
563 *Immunol.* 162, 1-11.
- 564 Fontes, L.B.A., Dias, D.S., Carvalho, L.S.A., Mesquita, H.L., Reis, L.S., Dias, A.T., Da  
565 Silva Filho, A.A., Corrêa, J.O.A., 2014. Immunomodulatory effects of  
566 licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Pharm.*  
567 *Pharmacol.* 66 (6), 886-894.
- 568 Fontes, L.B.A., Dias, D.S., Aarestrup, B.J.V., Aarestrup, F.M., Da Silva Filho, A.A.,  
569 Corrêa, J.O.A., 2017. Caryophyllene ameliorates the development of experimental  
570 autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Biomed. Pharmacother.* 91,  
571 257-264.
- 572 Galuppo, M., Giacoppo, S., Nicola, G.R.D., Iori, R., Navarra, M., Lombardo, G.E.,  
573 Bramanti, P., Mazzon, E., 2014. Anti-inflammatory activity of glucomoringin

- 574 isothiocyanate in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis.  
575 *Fitoterapia* 95, 160-174.
- 576 Gijbels, K., Brocke, S., Abrams, J.S., Steinman, L., 1995. Administration of  
577 neutralizing antibodies to Interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune  
578 encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in  
579 Central Nervous System and circulation. *Mol. Med.* 1, 795-805.
- 580 Giocoppo, S., Galuppo, M., Lombardo, G.E., Ulaszewska, M.M., Mattivi, F.,  
581 Bramanti, P., Mazzon, E., Navarra, M., 2015. Neuroprotective effects of a  
582 polyphenolic white grape juice extract in a mouse model of experimental  
583 autoimmune encephalomyelitis. *Fitoterapia*, 103, 171-186.
- 584 Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum,  
585 S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids.  
586 *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
- 587 Higashi, C., Kawaji, A., Tsuda, N., Hayashi, M., Saito, R., Yagishita, Y., Suzuki, T.,  
588 Uruno, A., Nakamura, M., Nakao, K., Furusako, S., Yamamoto, M., 2017. The  
589 novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune  
590 encephalomyelitis in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 802, 76-84.
- 591 Hueso-Falcón, I., Cuadrado, I., Cidre, F., Amaro-Luis, J.M., Ravelo, A.G., Estevez-  
592 Braun, A., De Las Heras, B., Hortelano, S., 2011. Synthesis and anti-  
593 inflammatory activity of *ent*-kaurene derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 1291-  
594 1305.
- 595 Johns, L.D., Flanders, K.C., Ranges, G.E., Sriram, S., 1991. Successful treatment of  
596 allergic encephalomyelitis with transforming growth factor-beta 1. *J. Immunol.* 147  
597 (6), 1792-1797.

- 598 Johns, L.D., Sriram, S., 1993. Experimental allergic encephalomyelitis: neutralizing  
599 antibody to TGF-beta 1 enhances the clinical severity of the disease. J.  
600 Neuroimmunol. 47 (1), 1-7.
- 601 Kamisli, S., Ciftci, O., Taslidere, A., Turkmen, N.B., Ozcan, C., 2018. The beneficial  
602 effects of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid on the experimental autoimmune  
603 encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mouse model. Immunopharm. Immunot.  
604 40, 344-352.
- 605 Kim, K.H., Sadikot, R.T., Joo, M., 2016. Therapeutic effect of *ent*-kaur-16-en-19-oic  
606 acid on neutrophilic lung inflammation and sepsis is mediated by Nrf2. Biochem.  
607 Biophys. Res. Commun. 474, 534-540.
- 608 Kim, K.H., Han, J.W., Jung, S.S., Park, B., Han, C.W., Joo, M., 2017. Kaurenoic acid  
609 activates TGF- $\beta$  signaling. Phytomedicine 32, 8-14.
- 610 Kipp, M., Nyamova, S., Hochstrasser, T., Amor, S., 2017. Multiple sclerosis animal  
611 models: a clinical and histopathological perspective. Brain Pathol. 27, 123-137.
- 612 Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H.,  
613 Tanaka, N., Morigushi, T., Motohasi, H., Nakayama, K., Yamamoto, M., 2016.  
614 Nrf2 supresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory  
615 cytokine transcription. Nat. Commun. 23 (7), 11624.
- 616 Lee, P.W., Severin, M.E., Lovett-Racke, A.E., 2017. TGF- $\beta$  regulation of  
617 encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis. Eur. J. Immunol. 47,  
618 446-453.
- 619 Leiper, J., Nandi, M., 2011. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors  
620 of nitric oxide synthesis. Nat. Rev. Drug Discov. 10, 277-291.
- 621 Li, B., Cui, W., Liu, J., Li, R., Liu, Q., Xie, X.H., Zhang, J., Song, X.J. , Wang, Y.,  
622 Guo, L., 2013. Sulforaphane ameliorates the development of experimental

- 623 autoimmune encephalomyelitis by antagonizing oxidative stress and Th 17-related  
624 inflammation in mice. *Exp. Neurol.* 250, 239-249.
- 625 Li, X., Zhao, L., Han, J.J., Zhang, F., Liu, S., Zhu, L., Wang, Z.Z., Zhang, G.X., Zhang,  
626 Y., 2018. Carnosol modulates Th17 cell differentiation and microglial switch in  
627 experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front. Immunol.* 9, 1807.
- 628 Lyu, J.H., Lee, G.S., Kim, K.H., Kim, H.W., Cho, S.I., Jeong, S.I., Kim, H.J., Ju, Y.S.,  
629 Kim, H.K., Sadikot, R.T., Christoman, J.W., Oh, S.R., Lee, H.K., Ahn, K.S., Joo,  
630 M., 2011. *Ent-kaur-16-en-19-oic* acid, isolated from the roots of *Aralia*  
631 *continentalis*, induces activation of Nrf2. *J. Ethnopharmacol.* 137 (3), 1442-1449.
- 632 Mahamoodi, M., Amiri, H., Ayoobi, F., Rahmani, M., Taghipour, Z., Ghavamabadi,  
633 R.T., Jafarzadeh, A., Sankian, M., 2019. Carvacrol ameliorates experimental  
634 autoimmune encephalomyelitis through modulating pro- and anti-inflammatory  
635 cytokines. *Life Sci.* 219, 257-263.
- 636 Matos, D.M., Viana, M.R., Alvim, M.C.O., Carvalho, L.S.A., Leite, L.H.R., Da Silva  
637 Filho, A.A., Nascimento, J.W.L., 2018. Pharmacokinetics profile and oral  
638 bioavailability of kaurenoic acid from *Copaifera spp* in rats. *Fitoterapia.* 128, 142-  
639 147.
- 640 McGinley, A.M., Edwards, S.C., Raverdeau, M., Mills, K.H.G., 2018. Th17 cells, T  
641 cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* 87, 97-108.
- 642 Mizokami, S.S., Arakawa, N.S., Ambrosio, S.R., Zarpelon, A.C., Casagrande, R.,  
643 Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verii, W.A., 2012. Kaurenoic acid from  
644 *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: Effect on cytokine production  
645 and activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase GATP-sensitive potassium  
646 channel signaling pathway. *J. Nat. Prod.* 75 (5), 896-904.

- 647 Nagato, A.C., Bezerra, F.S., Talvani, A., Aarestrup, B.J.V., Aarestrup, F.M., 2015.  
648 Hyperoxia promotes polarization of the immune response in ovalbumin-induced  
649 airway inflammation, leading to a Th17 cell phenotype, *Immun. Inflam. Dis.* 3,  
650 321-337.
- 651 Paiva, L.A.F., Gurgel, L.A., Silva, R.M., Tomé, A.R., Gramosa, N.V., Silveira, E.R.,  
652 Santos, F.A., Rao, V.S., 2002. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a  
653 diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acid-induced colitis in rats. *Vasc.*  
654 *Pharmacol.* 39 (6), 303-307.
- 655 Pareek, T.K., Belkadi, A., Kesavapany, S., Zaremba, A., Loh, S.L., Bai, L., Cohen,  
656 M.L., Meyer, C., Liby, K.T., Miller, R.H., Sporn, M.B., Letterio, J.J., 2011.  
657 Triterpenoid modulation of IL-17 and Nfr-2 expression ameliorates  
658 neuroinflammation and promotes remyelination in autoimmune  
659 encephalomyelitis. *Sci. Rep.* 201, 1-11.
- 660 Peron, J.P.S., Yang, K., Chen, M.L., Brandão, W.N., Basso, A.S., Commodaro, A.G.,  
661 Weiner, H.L., Rizzo, L.V., 2010. Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the  
662 overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. *J.*  
663 *Neuroimmunol.* 227, 10-17.
- 664 Rodgers, J.M., Miller, S.D., 2012. Cytokine control of inflammation and repair in the  
665 pathology of multiple sclerosis. *Yale J. Biol. Med.* 85, 447-468.
- 666 Van Horsen, J., Schreibelt, G., Bö, L., Montagne, L., Drukarch, B., Van Muiswinkel,  
667 F.L., De Vries, H.E., 2006. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 expression in  
668 multiple sclerosis lesions. *Free Rad. Biol. Med.* 41, 311–317.
- 669 Wyss-Coray, T., Borrow, P., Brooker, M.J., Mucke, L., 1997. Astroglial overproduction  
670 of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in  
671 transgenic mice. *J. Neuroimmunol.* 77 (1), 45-50.

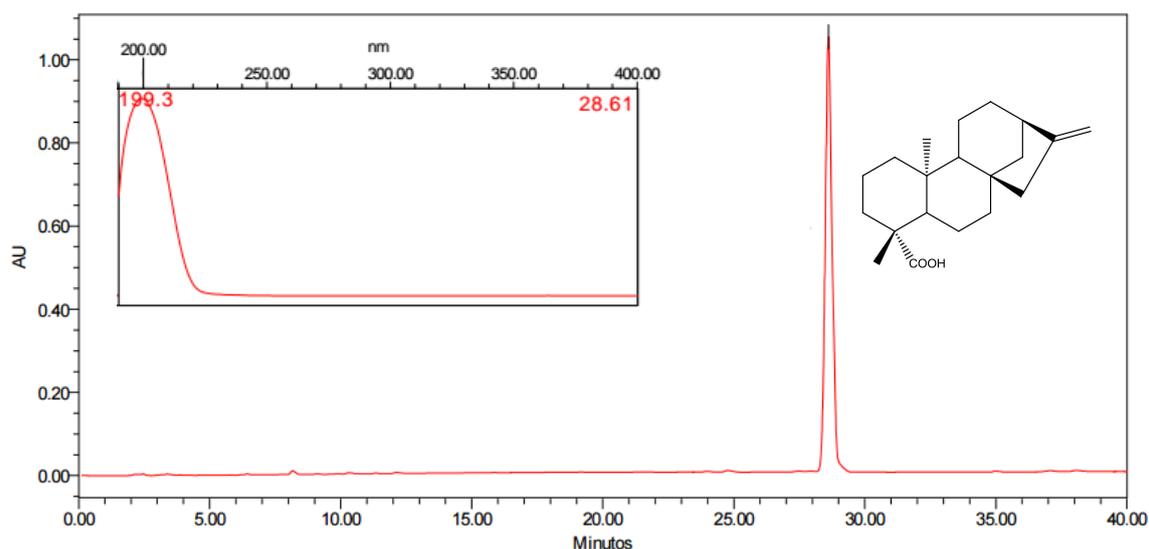
672 Yang, H., Liu, C., Jiang, J., Wamge, Y., Zhang, X., 2017. Celastrol attenuates multiple  
673 sclerosis and optic neuritis in an experimental autoimmune encephalomyelitis  
674 model. *Front. Pharmacol.* 8, 44.

675 Zhang, M., Zhao, C., Dai, W., He, J., Jiao, S., Baocai, L., 2017. Anti-inflammatory *ent-*  
676 kaurenoic acids and their glycosides from *Gochnatia decora*. *Phytochemistry* 137,  
677 174-181.

678 Zhang, X., Reddy, J., Ochi, H., Frenkel, D., kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 2006.  
679 Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF-beta dependent  
680 and associated with increases in CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Int.*  
681 *Immunol.* 18 (4), 495-503.

682

683



684

685 **Fig. 1.** HPLC chromatogram ( $\lambda = 200$  nm), UV spectrum and chemical structure of  
686 kaurenoic acid (KA) isolated from the roots of Yacon (*S. sonchifolius*).

687

688

689

690 **Table 1**

691 Viability and *in vitro* effects of KA ( $\mu\text{M}$ ) on NO and cytokine production by  
 692 splenocytes from EAE-induced mice cultured after MOG stimulation.

Groups	Viability <sup>a</sup>	Cytokine production				
		NO <sup>b,c</sup>	TNF- $\alpha$ <sup>b,d</sup>	IFN- $\gamma$ <sup>b,d</sup>	IL-6 <sup>b,d</sup>	IL-17 <sup>b,d</sup>
EAE	-	32.72 $\pm$ 1.0	637.0 $\pm$ 12.6	943.3 $\pm$ 34.3	1362.2 $\pm$ 135.6	1528.1 $\pm$ 55.9
Control	100.0 $\pm$ 0.1	13.24 $\pm$ 1.7 <sup>#</sup>	178.3 $\pm$ 10.1 <sup>#</sup>	384.0 $\pm$ 40.6 <sup>#</sup>	501.3 $\pm$ 38.4 <sup>#</sup>	559.5 $\pm$ 23.98 <sup>#</sup>
KA 50 $\mu\text{M}$	97.92 $\pm$ 0.4	21.42 $\pm$ 0.1 <sup>#</sup> (34.5%)	380.0 $\pm$ 40.8 <sup>#</sup> (40.3%)	533.3 $\pm$ 11.1 <sup>#</sup> (43.5%)	652.8 $\pm$ 31.9 <sup>#</sup> (52.1%)	837.1 $\pm$ 40.8 <sup>#</sup> (45.2%)
KA 100 $\mu\text{M}$	85.85 $\pm$ 0.2	10.76 $\pm$ 0.9 <sup>#</sup> (67.1%)	380.0 $\pm$ 40.8 <sup>#</sup> (59.3%)	389.3 $\pm$ 29.0 <sup>#</sup> (58.7%)	547.6 $\pm$ 43.8 <sup>#</sup> (59.8%)	671.5 $\pm$ 50.4 <sup>#</sup> (56.0%)
KA 200 $\mu\text{M}$	20.48 $\pm$ 0.1	-	-	-	-	-

693 <sup>a</sup> Results were expressed as % (mean  $\pm$  standard deviation) using MTT assay.

694 <sup>b</sup> Percentage of inhibition, in comparison to EAE group, are expressed in brackets.

695 <sup>c</sup> Results were expressed  $\mu\text{M}$  as mean  $\pm$  standard deviation.

696 <sup>d</sup> Results were expressed in pg/mL as mean  $\pm$  standard deviation.

697 <sup>#</sup>  $p < 0.001$  in comparison to EAE group.

698

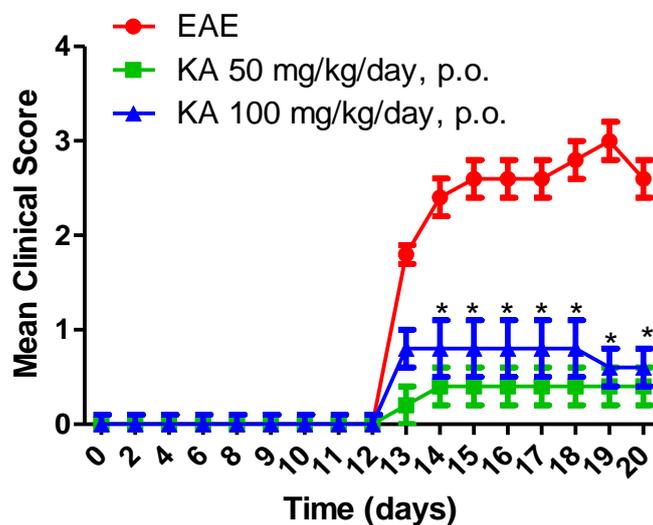
699

700

701

702

703



704

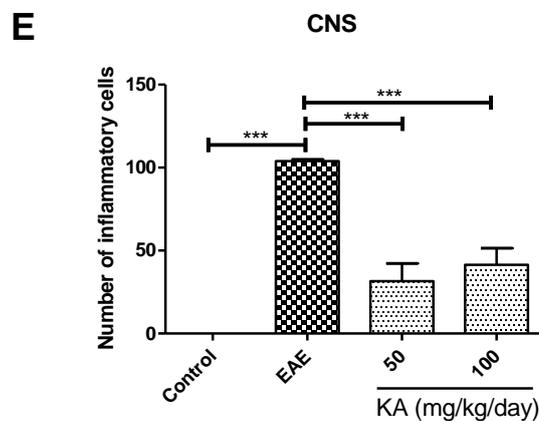
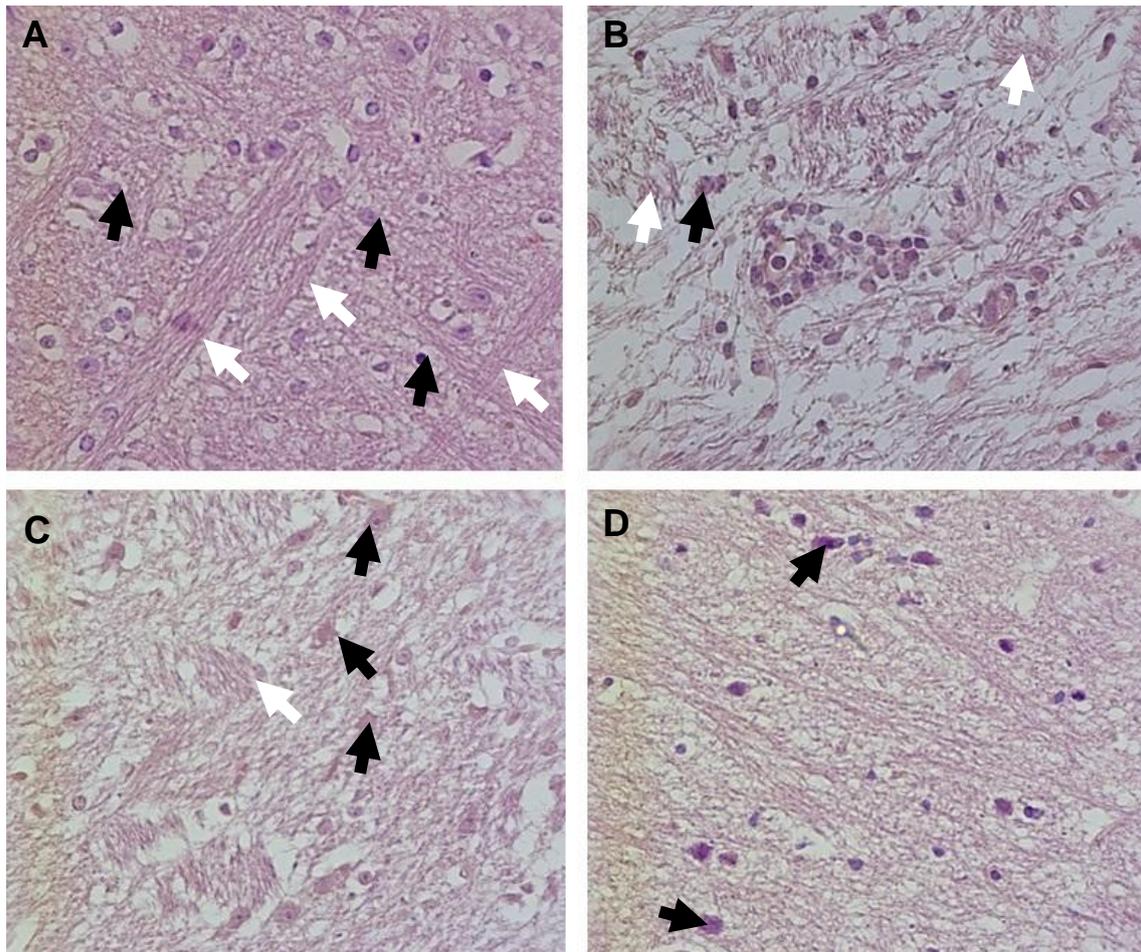
705 **Fig. 2.** Effects of KA on clinical score of EAE-induced mice. Clinical signs were  
 706 evaluated daily and expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). \* $p < 0.05$  in  
 707 comparison to EAE group.

708

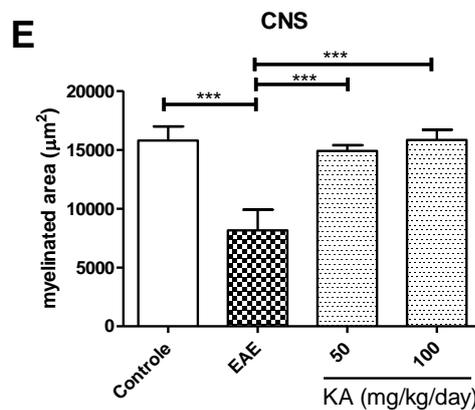
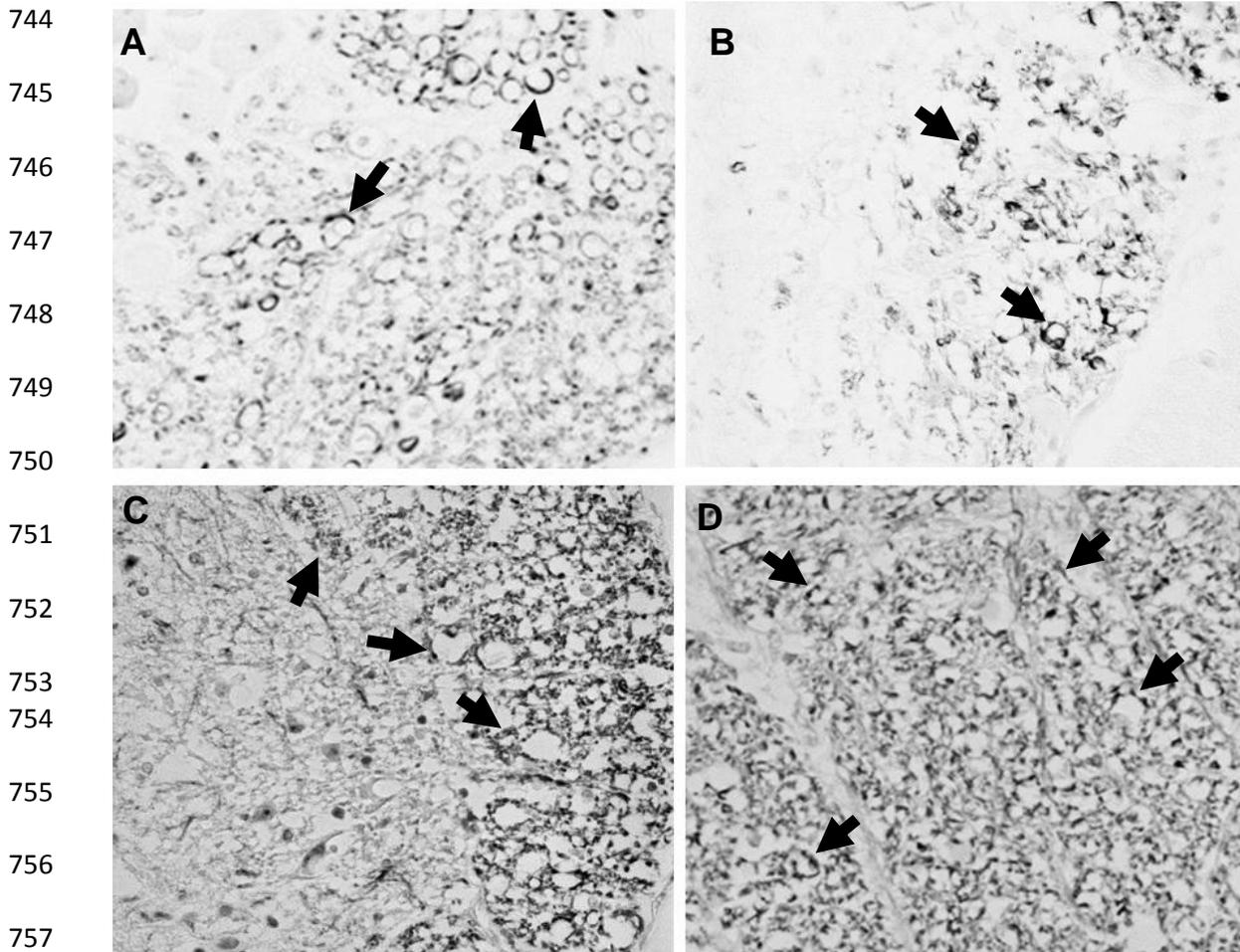
709

710

711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731



733 **Fig. 3.** Inflammatory infiltrate into the CNS stained with hematoxylin and eosin. CNS  
734 samples (spinal cord, brain and cerebellum) were collected from: control (A); EAE-  
735 mice treated with vehicle (B), KA 50 mg/kg (C), KA 100 mg/kg (D). Original  
736 magnification  $\times 400$ . Black Arrows: neuron cell nuclei; White Arrows: myelinated nerve  
737 bundles. (E): Histomorphometry analysis of the total number of inflammatory cells in  
738 the CNS. Sections were scanned and captured using a light microscope with a digital  
739 camera (AxioCam CHF 5, Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011). Zeiss Zen2012  
740 software was used to determine the number of inflammatory cells. Results were  
741 expressed as mean of the total inflammatory cells  $\pm$  standard deviation (SD) and were  
742 considered statistically significant results with  $p < 0.001$  (\*\*\*) in comparison with EAE  
743 group.



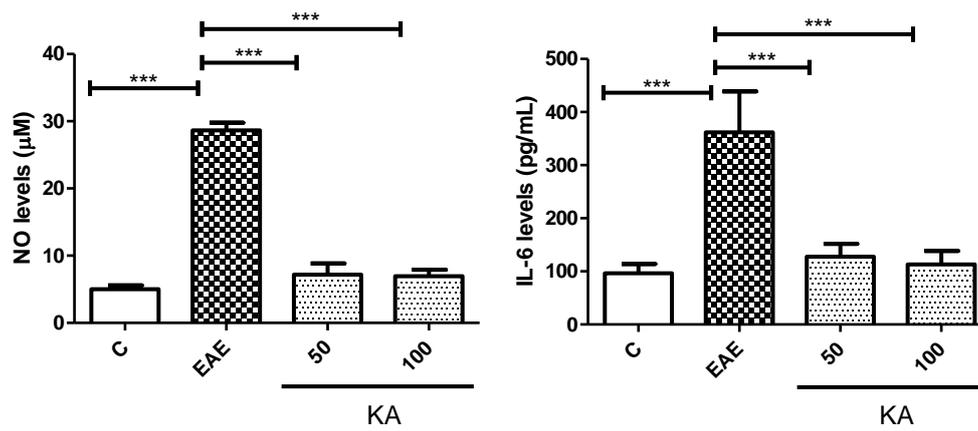
758

759 **Fig. 4:** Representative CNS sections stained with Weigert-Pal-Russel Hematoxylin to  
760 detect myelinated areas (A-D). Normal C57BL/6 mice (A); EAE-mice (B), EAE-mice  
761 treated with KA 50 mg/kg/day (C) and 100 mg/kg/day (D). Original magnification  
762  $\times 400$ . Black Arrows highlighted myelin sheaths in dark gray. (E) Myelin quantification  
763 in CNS showing total measure of the white matter area (in  $\mu\text{m}^2$ ).  $p < 0.001$  (\*\*\*) in  
764 comparison with control group.

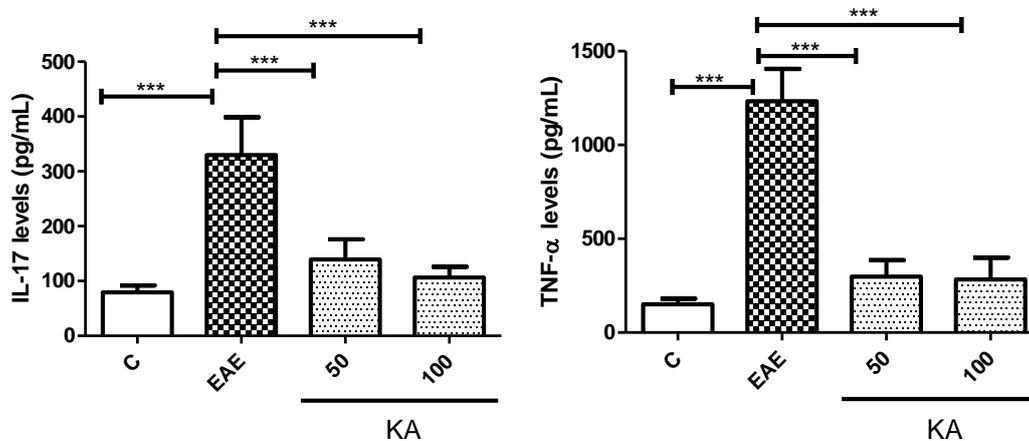
765

766

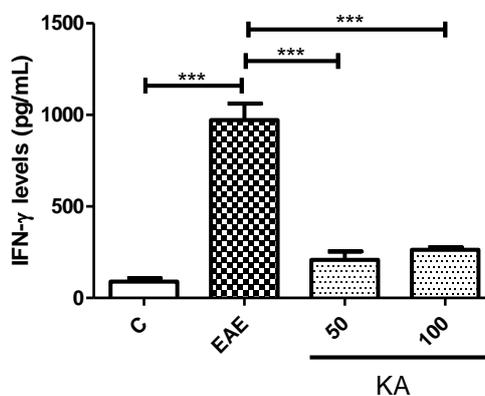
767



768



769



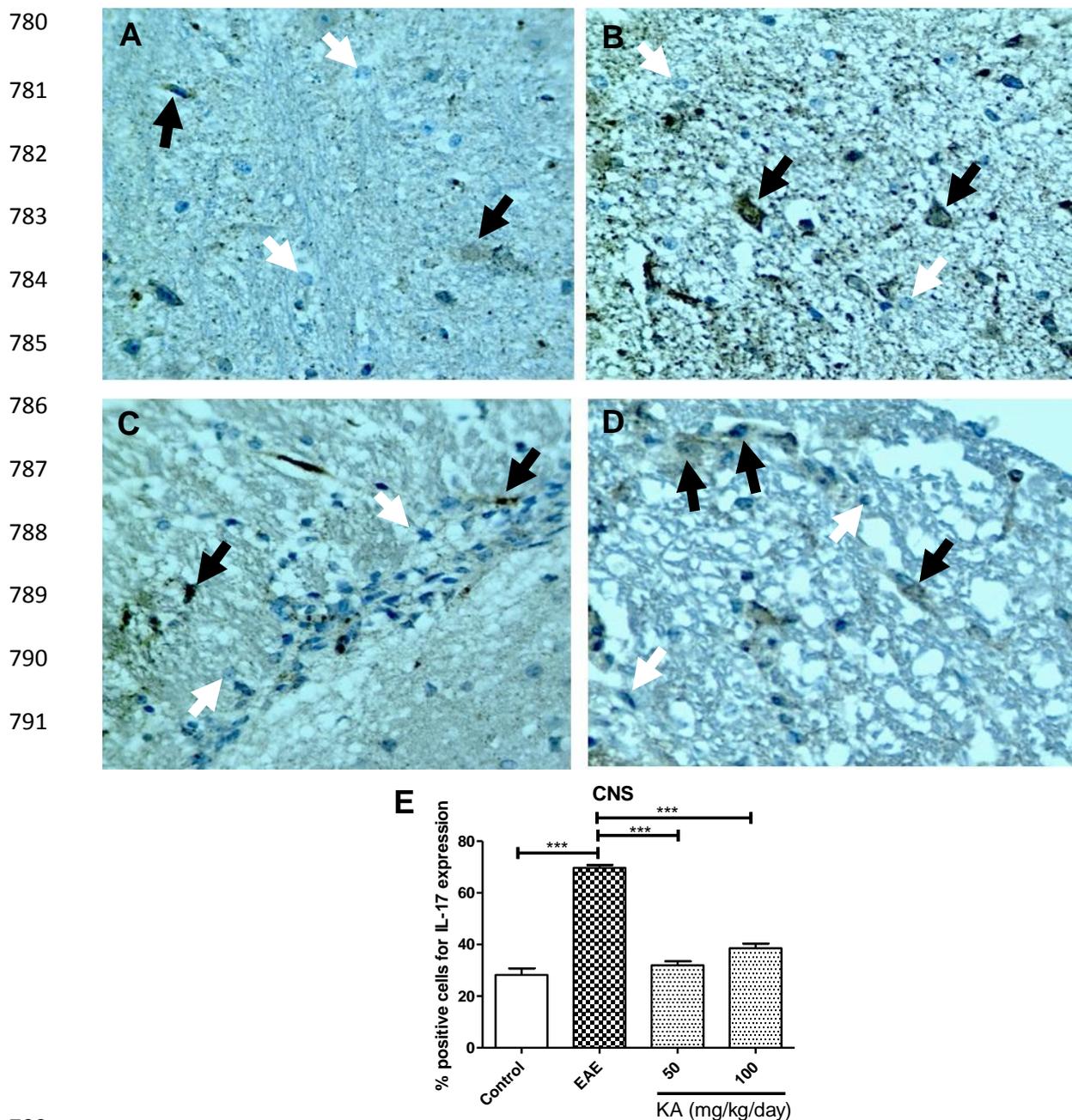
770

771 **Fig. 5.** Effect of the *in vivo* treatment with KA (50 and 100 mg/kg/day) on cytokines  
 772 and NO production by splenocytes from EAE-mice. Splenocytes were obtained from  
 773 EAE-mice treated with KA (50 and 100 mg/kg/day) and the levels of NO, IL-6, IL-17,  
 774 TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  were determined. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation  
 775 (SD) and were considered statistically significant results with  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$   
 776 (\*\*\*) in comparison with EAE group.

777

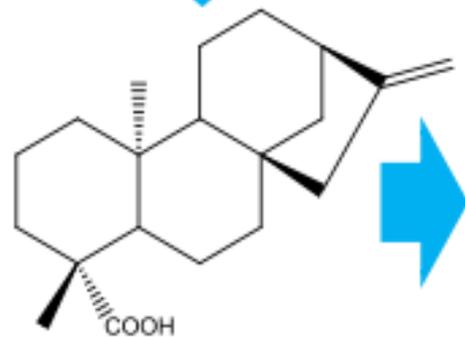
778

779



793 **Fig. 6.** IL-17 immunohistochemistry analysis of CNS. Normal C57BL/6 mice (A);  
794 EAE-mice (B), EAE-mice treated with KA 50 mg/kg/day (C) or KA 100 mg/kg/day  
795 (D). (Original magnification  $\times 400$ ). Black Arrows indicate positive stained cells for IL-  
796 17 expression, with brown color in cytoplasm. White arrows indicate negative stained  
797 cells for IL-17 expression. (E) Percentage of positive staining cells for IL-17 expression  
798 per microscopic field ( $\times 400$  magnification). Results were expressed as mean of  
799 percentage for positive staining cells  $\pm$  standard deviation (SD) and were considered  
800 statistically significant results with  $p < 0,001$  (\*\*\*) in comparison with EAE group  
801 (Camera Sony DCR-PC 100 e Software Axiovision release<sup>®</sup> version 4.8).

# Graphical Abstract



**Kaurenoic acid**

