

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade**

**Karla Antunes Ramos**

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Anadenanthera colubrina* NA  
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE  
EXPERIMENTAL**

**Teófilo Otoni**

**2023**

**Karla Antunes Ramos**

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Anadenanthera colubrina* NA  
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE  
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade nível de Mestrado como parte dos requisitos para obtenção do título de Magister Scientiae da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Mucuri.

Orientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves.  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra de Paula Carli.

**Teófilo Otoni - MG**

**2023**

### Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

R175a 2023	<p>Ramos, Karla Antunes</p> <p>Avaliação do extrato etanólico de <i>Anadenanthera colubrina</i> na modulação da resposta imune na encefalomielite autoimune experimental [manuscrito] / Karla Antunes Ramos. -- Teófilo Otoni, 2023.</p> <p>78 p. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Caio César de Souza Alves. Coorientador: Prof. Alessandra de Paula Carli.</p> <p>Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia, Ambiente e Sociedade) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, Teófilo Otoni, 2023.</p> <p>1. Esclerose Múltipla. 2. Inflamação. 3. Fitoterapia. 4. Imunologia. 5. Plantas medicinais. I. Alves, Caio César de Souza. II. Carli, Alessandra de Paula. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.</p>
---------------	---

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-2886 e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM

**Karla Antunes Ramos**

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Anadenanthera colubrina* NA  
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE  
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade nível de Mestrado como parte dos requisitos para obtenção do título de Magister Scientiae da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Mucuri.

Orientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves.  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra de Paula Carli.

Data da aprovação: 19/04/2023



Documento assinado digitalmente  
CAIO CESAR DE SOUZA ALVES  
Data: 20/04/2023 11:10:43-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES – UFVJM



Documento assinado digitalmente  
ALESSANDRA DE PAULA CARLI  
Data: 26/04/2023 13:30:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ALESSANDRA DE PAULA CARLI – UFVJM



Documento assinado digitalmente  
CLEIDE APARECIDA BOMFETI  
Data: 24/04/2023 13:25:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> CLEIDE APARECIDA BOMFETI – UFVJM



Documento assinado digitalmente  
FERNANDO LEITAO ROCHA JUNIOR  
Data: 25/04/2023 13:39:12-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. FERNANDO LEITÃO – UFVJM



Documento assinado digitalmente  
FLAVIA MARCIA DE CASTRO E SILVA  
Data: 19/04/2023 17:40:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> FLÁVIA MÁRCIA CASTRO E SILVA – UERJ

**Teófilo Otoni**

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahtma Gandhi

## AGRADECIMENTOS

Chegado aqui resta-me agradecer a todos quantos direta ou indiretamente contribuíram para a finalização deste percurso.

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre comigo me dando força, sabedoria e perseverança em busca dos meus objetivos.

Ao meu marido Neto, pelo companheirismo, paciência, incentivo e cuidado com os nossos filhos durante a minha ausência. Sem esse suporte nada seria possível!

Aos meus filhos Lucas e Davi, por entenderem que a minha ausência era por uma boa causa e espero recompensá-los em um futuro bem próximo.

Ao meu amigo Sayton que me incentivou e ajudou com todas as burocracias para o ingresso neste mestrado, quanto o apoio durante essa jornada.

Ao Professor Doutor Caio César pela excelente orientação, seriedade, ideias e discussões que foram fundamentais na construção deste trabalho.

À Professora Doutora Alessandra Carli pela excelente coorientação, seriedade, apoio e disponibilidade que demonstrou ao longo desses meses que foram fundamentais para a construção deste trabalho.

À Professora Doutora Sandra por ajudar e compartilhar seus conhecimentos e por trazer Elaine para fazermos os experimentos juntas, que foi uma parceira que não poderia ser melhor. Juntas compartilhamos experiências, ensinamentos, conhecimentos, dúvidas, angústias, cansaço e no final ganhei uma grande amiga.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Geralda que sempre me apoiou, à minha irmã Bruna, ao meu Pai Adalciney e à minha avó Adalice.

Às pessoas que tornaram este trabalho possível com as mais diferentes contribuições: todos os alunos da iniciação científica (Igor, Larissa, Mariana, Pietra), os técnicos de laboratórios (Leide, Jander, Tiago), os amigos (Ana Paula, Gracimerio, Jeanne, Manuela, Marcela, Noádia, Renan, Virginia, Zoraide).

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa da minha vida.

## RESUMO

A Esclerose Múltipla é uma doença autoimune que afeta mais de dois milhões de pessoas em todo o mundo, e caracteriza-se por apresentar inflamação crônica desmielinizante do sistema nervoso central. A *Anadenanthera colubrina* é uma planta estudada por sua atividade anti-inflamatória. Apesar deste potencial ser conhecido, não se tem estudos da sua ação diante da esclerose múltipla. Embora existam opções de tratamento disponíveis para pacientes com esclerose múltipla, estas não são capazes de reverter a doença, além disso, os efeitos colaterais dos fármacos existentes, associados a um custo elevado do tratamento tornam relevante a pesquisa de novas substâncias com potencial para serem aplicadas no tratamento da esclerose múltipla. Diante desse cenário, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato etanólico de *Anadenanthera colubrina* (EtAc) na modulação da resposta imune no modelo de encefalomielite autoimune experimental. O modelo foi desenvolvido em camundongos fêmeas C57BL/6 através da aplicação da MOG<sub>35-55</sub>. No 15º dia após a MOG<sub>35-55</sub> o tratamento foi iniciado com o EtAc por gavagem por um período de seis dias, avaliando o score clínico e o peso de todos os animais diariamente. No 21º dia após a indução, os animais foram eutanasiados para a coleta de cérebro, medula espinhal, baço e linfonodo. A concentração de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL10, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$  em macerados de cérebro e medula espinhal foram determinados por ELISA. A quantidade de células mononucleares isoladas do cérebro, medula espinhal, linfonodo e baço expressando marcadores de superfície (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD11<sup>+</sup>c) e produzindo citocinas CD4<sup>+</sup> IL-17, CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  ou fator de transcrição CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10 foram determinadas por citometria de fluxo. As análises histológicas de cérebro e medula espinhal foram realizadas por coloração de Hematoxilina e Eosina para a observação de infiltrados celulares inflamatórios e luxol *fast blue* para observação da desmielinização. Os resultados indicam que o EtAc melhora os sinais clínicos da EAE, o que pode ser correlacionado com a redução observada na produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ . Além disso, o tratamento com EtAc aumentou a liberação de citocina anti-inflamatória IL10 no cérebro e isto pode ser correlacionado com a redução de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 e IFN- $\gamma$ , CD8<sup>+</sup> e CD11<sup>+</sup>c na medula espinhal, cérebro, baço e linfonodo dos animais. Além disso na análise histológica observou-se a redução da desmielinização e infiltrados celulares inflamatórios no SNC. Desta forma, os dados indicam um papel supressor significativo do processo inflamatório promovido pelo EtAc no modelo EAE e possivelmente na EM.

**Palavras-chave:** Esclerose Múltipla. Inflamação. Fitoterapia. Imunologia. Plantas medicinais.

## ABSTRACT

Multiple Sclerosis is an autoimmune disease that affects more than two million people worldwide, and is characterized by chronic demyelinating inflammation of the central nervous system. *Anadenanthera colubrina* is a plant studied for its anti-inflammatory activity. Although this potential is known, there are no studies of its action against multiple sclerosis. Although there are treatment options available for patients with multiple sclerosis, these are not able to reverse the disease. Moreover, the side effects of existing drugs, associated with a high cost of treatment, make it relevant the research of new substances with potential to be applied in the treatment of multiple sclerosis. Given this scenario, this work aimed to evaluate the effect of ethanolic extract of *Anadenanthera colubrina* (EtAc) in modulating the immune response in the model of experimental autoimmune encephalomyelitis. The model was developed in female C57BL/6 mice by applying MOG35-55. On day 15 after MOG35-55 treatment was initiated with EtAc by gavage for a period of six days, assessing the clinical score and weight of all animals daily. On the 21st day after induction, the animals were euthanized for brain, spinal cord, spleen and lymph node collection. The concentration of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL10, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$  in brain and spinal cord macerates were determined by ELISA. The amount of mononuclear cells isolated from brain, spinal cord, lymph node and spleen expressing surface markers (CD4+, CD8+ CD11+c) and producing cytokines CD4+ IL-17, CD4+ IFN- $\gamma$  or transcription factor CD4+Foxp3+IL-10 were determined by flow cytometry. Histological analyses of brain and spinal cord were performed by Hematoxylin and Eosin staining to observe inflammatory cell infiltrates and luxol fast blue to observe demyelination. The results indicate that EtAc improves the clinical signs of EAE, which can be correlated with the observed reduction in the production of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ . Furthermore, EtAc treatment increased the release of anti-inflammatory cytokine IL10 in the brain and this may be correlated with the reduction of IL-17 and IFN- $\gamma$  producing CD4+, CD8+ and CD11+c cells in the spinal cord, brain, spleen and lymph node of the animals. In addition in histological analysis the reduction of demyelination and inflammatory cell infiltrates in the CNS was observed. Thus, the data indicate a significant suppressive role of the inflammatory process promoted by EtAc in the EAE model and possibly in MS.

**Keywords:** Multiple Sclerosis. Inflammation. Phytotherapy. Immunology. Medicinal Plants.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Prevalência da Esclerose Múltipla por país (2020) .....	16
Figura 2 – Principais mecanismos imunológicos da Esclerose Múltipla .....	20
Figura 3 – Formas clínicas da Esclerose Múltipla .....	22
Figura 4 – Distribuição fitogeográfica da <i>A. colubrina</i> no Brasil .....	27
Figura 5 – Representação da <i>Anadenanthera colubrina</i> (árvore completa e partes aéreas – folhas e frutos).....	27
Figura 6 – Estrutura básica dos flavonoides .....	29
Figura 7 – Localização da coleta da <i>A. colubrina</i> . Região da APA, comunidade de Baixão, município de Caraí-MG, local da coleta do material.....	35
Figura 8 – Preparação do extrato etanólico da <i>A. colubrina</i> .....	36
Figura 9 – Indução da EAE (encefalomielite autoimune experimental) em camundongos ...	37
Figura 10 – Avaliação dos sinais clínicos da EAE .....	43
Figura 11 – Número de células isoladas da medula espinhal (A) e cérebro (B) no 210 dia após a imunização com peptídeo MOG 35-55 .....	46
Figura 12 – Número de células isoladas do linfonodo (A) e baço (B) no 210 dia após a imunização com peptídeo MOG 35-55 .....	47
Figura 13 – Números de células CD11+c no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro)..48	
Figura 14 – Números de células CD8+ no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro) .49	
Figura 15 – Números de células CD4+, CD4+CD25+ no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro) .....	49
Figura 16 – Números de células Foxp3+CD4+ IL-10 no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro) .....	50
Figura 17 – Números de células Foxp3+CD4+ IL-17, CD4+ IFN- $\gamma$ no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro).....	51
Figura 18 – Números de células CD11+c em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais) .....	52
Figura 19 – Números de células CD8+ em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais) .....	53
Figura 20 – Números de células CD4+, CD4+CD25 em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais) .....	54
Figura 21 – Números de células Foxp3+CD4+ IL-10 em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais) .....	55

Figura 22 – Números de células CD4+ IL-17, CD4+ IFN- $\gamma$ em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais) .....	56
Figura 23 – Histopatologia da medula espinhal dos camundongos.....	57
Figura 24 – Histopatologia do cérebro dos camundongos .....	58
Figura 25 – Análise da desmielinização na medula espinhal dos camundongos .....	59
Figura 26 – Análise da desmielinização no cérebro dos camundongos.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos flavonoides isolados de <i>Anadenanthera colubrina</i> , adaptado de WEBER, 2011.....	30
Tabela 2 – Comportamento clínico de diferentes linhagens de camundongos induzidos com MOG ou peptídeos derivados de MOG.....	32
Tabela 3 – Escala de incapacidade neurológica .....	38
Tabela 4 – Avaliação das citocinas no cérebro.....	44
Tabela 5 – Avaliação das citocinas na medula espinhal .....	45

## LISTA DE SIGLAS

<i>A. colubrina</i>	<i>Anadenanthera colubrina</i>
ABEM	Associação Brasileira de Esclerose Múltipla
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA	Área de Proteção Ambiental
BHE	Barreira Hematoencefálica
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CFA	Adjuvante de Freund
CIS	Síndrome Clinicamente Isolada
DMF	Fumarato de dimetila
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Primária Progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundária Progressiva
EtAc	Esclerose Extrato Etanólico de <i>Anadenanthera colubrina</i>
FDA	US food and drug administration
Foxp3	Fator de transcrição <i>forkhead box P3</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
ICAM – 1	Molécula de adesão intercellular - 1
IFN	Interferon
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IFN- $\beta$	Inteferon beta
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12 subunidade 70
LCR	Líquido cefaloraquidiano

LTC4	Leucotrienos C4
MAG	Glicoproteína associada á mielina
MG	Minas gerais
MHC	Complexo Major de histocompatibilidade
MMP-9	Metaloproteinase 9
MOG	Glicoproteína Associada ao Oligodendrócitos
MPB	Proteína básica de mielina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PLP	Proteína proteolípídeo
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- $\beta$	Fator Beta de Transformação de Crescimento
Th1	Células T auxiliares do tipo 1
Th2	Células T auxiliares do tipo 2
Th17	Células T auxiliares do tipo 17
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VCAM-1	Molécula de Adesão de Células Vasculares-1
VLA-4	Integrina Alfa 4 Beta 1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Esclerose Múltipla .....</b>	<b>15</b>
2.1.1	<i>Aspectos epidemiológicos .....</i>	<i>15</i>
2.1.2	<i>Etiologia.....</i>	<i>16</i>
2.1.3	<i>Fisiopatologia .....</i>	<i>17</i>
2.1.4	<i>Tratamentos .....</i>	<i>22</i>
<b>2.2</b>	<b>Plantas medicinais .....</b>	<b>26</b>
2.2.1	<i>Anadenanthera colubrina .....</i>	<i>26</i>
<b>2.3</b>	<b>Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) .....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta e preparação do extrato etanólico de <i>Anadenanthera colubrina</i> (EtAc)....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento dos estudos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Animais e aspectos éticos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Indução da EAE (Encefalomielite Autoimune Experimental) .....</b>	<b>36</b>
4.4.1	<i>Tratamento com o extrato etanólico de A. colubrina (EtAc).....</i>	<i>37</i>
4.4.2	<i>Avaliação clínica.....</i>	<i>37</i>
4.4.3	<i>Obtenção de plasma, órgãos e células .....</i>	<i>39</i>
<b>4.5</b>	<b>Análise histopatológica .....</b>	<b>39</b>
<b>4.6</b>	<b>Dosagem de citocinas por ELISA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação dos leucócitos através da citometria de fluxo .....</b>	<b>40</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Avaliação do curso clínico da doença.....</b>	<b>42</b>
<b>5.2</b>	<b>Avaliação dos níveis de citocinas na medula e cérebro .....</b>	<b>43</b>
<b>5.3</b>	<b>Contagem de células .....</b>	<b>45</b>
5.3.1	<i>Valores de células no sistema nervoso central .....</i>	<i>45</i>
5.3.2	<i>Valores de células em órgãos linfoides secundários.....</i>	<i>46</i>
<b>5.4</b>	<b>Avaliação dos leucócitos através da citometria de fluxo .....</b>	<b>47</b>

5.4.1	<i>Expressão de marcadores celulares no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro).....</i>	47
5.4.2	<i>Expressão de marcadores celulares em órgãos linfoides secundários .....</i>	51
<b>5.5</b>	<b>Avaliação histopatológica .....</b>	<b>56</b>
5.5.1	<i>Avaliação do efeito do extrato etanólico de A. colubrina no infiltrado inflamatório da medula espinhal dos animais com EAE.....</i>	56
5.5.2	<i>Avaliação do efeito do extrato etanólico de A. colubrina no infiltrado inflamatório do cérebro dos animais com EAE.....</i>	57
5.5.3	<i>Avaliação do efeito do extrato etanólico de A. colubrina na desmielinização na medula espinhal dos animais com EAE.....</i>	58
5.5.4	<i>Avaliação do efeito do extrato etanólico de A. colubrina na desmielinização do cérebro dos animais com EAE.....</i>	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC), caracterizada pela infiltração de células mononucleares, desmielinização do axônio e gliose na bainha de mielina, que desencadeia a formação de múltiplas placas no SNC (MILO; MILLER, 2014). Esta destruição da bainha de mielina, produz um bloqueio do impulso elétrico até a célula alvo, resultando em diversos sintomas que podem ser desde distúrbios da fala até paralisia total (GOVERMAN, 2009).

Indivíduos acometidos com a Esclerose Múltipla apresentam uma ampla variedade de sintomas e sinais neurológicos, que tem sua gênese em diferentes partes do SNC. Em algumas pessoas, a doença apresenta um padrão progressivo, enquanto em outras a doença é caracterizada por períodos de recaída e remissão, tornando a vida dos doentes imprevisíveis, pois os sintomas nas crises vão aos poucos comprometendo a capacidade neurológica (MILO; MILLER, 2014).

A incidência de pessoas vivendo com EM em todo o mundo é de 36 pacientes para cada 100.000 pessoas. Apesar da EM ser relatada em todas as regiões do globo, uma maior incidência é registrada na Europa e na América do Norte. Esses resultados corroboram com estudos que relacionam a prevalência da EM com a latitude, sendo que pessoas que vivem em países mais próximos à linha do Equador têm um risco menor de desenvolver a EM (SIMPSON *et al.*, 2019). No Brasil, tem-se a maior incidência na região Sul e Sudeste, confirmando essa relação entre latitude e a EM. Segundo dados da Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM), atualmente tem-se aproximadamente 30 mil brasileiros acometidos com a doença.

Os portadores de EM apresentam lesões que são causadas por uma resposta autoimune direcionada aos componentes da bainha de mielina. A destruição da mielina, quando encontrada, vem acompanhada de células inflamatórias dentro ou ao redor das placas da EM, sendo este o foco de várias investigações. Atualmente, existem hipóteses que indicam que a doença inicia com células T CD4<sup>+</sup>, Th1(células T auxiliares do tipo 1) e Th17(células T auxiliares do tipo 17) que reagem contra antígenos da própria mielina e secretam citocinas, onde as células Th1 secretam interferon que ativam macrófagos e as células Th17 recrutam leucócitos. A desmielinização acontece devido aos leucócitos ativados liberando substâncias lesivas, porém não se sabe como é iniciada a reação imune (KUMAR *et al.*, 2010).

A farmacoterapia disponível para o tratamento da EM, tem como alvo principal a prevenção do processo inflamatório que acomete o SNC (ANAGNOSTOULI *et al.*, 2016).



Dentre os medicamentos citados nos protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas da EM no Brasil, encontram-se: teriflunomida, furamato de dimetila, fingolimode, natalizumabe, betainterferona e acetato de glatirâmer (BRASIL, 2021). Esses medicamentos não configuram tratamento definitivo, uma vez que retardam a progressão da doença, mas não reparam o dano já causado. Além disso, os medicamentos disponíveis não são totalmente eficazes e o uso prolongado os tornam inadequados devido a seus efeitos adversos notáveis que prejudicam a adesão ao tratamento (DE JONG *et al.*, 2017). Os efeitos colaterais dos medicamentos anti-inflamatórios para o indivíduo incluem desde úlceras estomacais até doenças cardiovasculares e renais de maior gravidade (BRANDÃO; RAMOS; SOUZA, 2016; SANTOS, 2017; SARINHO; MELO, 2017). Nesse contexto, a busca por tratamentos alternativos, capazes de controlar a progressão da doença, de forma segura, permanece um desafio para os pesquisadores da área.

A pesquisa por novas substâncias com potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa em produtos naturais (WHO, 2008) e fato, a OMS admite que cerca de 80% da população mundial, utiliza como principal fonte terapêutica a medicina tradicional, sendo essa um campo amplo para novas descobertas. No Brasil, o Decreto nº 5.813/ 2006 regulamenta a utilização de fitoterápicos pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). O uso da fitoterapia vem como terapia alternativa para pacientes com doenças neurodegenerativas, câncer e diabetes (MOLOUDIZARGARI *et al.*, 2013). Na China, é uma terapia que ganha destaque entre os pacientes acometidos por EM, para amenizar a gravidade da doença (OLSEN, 2009).

No Brasil, estudos previamente desenvolvidos com *Anadenanthera colubrina* revelaram o seu potencial farmacológico no tratamento de inflamações em geral (DANIEL *et al.*, 2014), como antifúngico (LIMA *et al.*, 2014; SILVA, 2019), antiproliferativo (LIMA *et al.*, 2014), anti-inflamatório (GUARNEIRE *et al.*, 2021), antioxidante (JUNIOR *et al.*, 2021) e anti-HIV (MAIA *et al.*, 2021). Considerando o componente inflamatório envolvido na EM e o potencial anti-inflamatório previamente demonstrado por *A. colubrina*, esse trabalho teve por objetivo avaliar o possível efeito do extrato etanólico de *A. colubrina* na modulação da resposta imune em modelo experimental de esclerose múltipla.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Esclerose Múltipla

#### 2.1.1 Aspectos epidemiológicos

Os primeiros relatos de distúrbios neuroinflamatórios vêm de registros pessoais. A Esclerose Múltipla (EM) teve o primeiro relato no ano de 1200 em uma mulher islandesa e em Santa Lidwina de Schiedam (1380-1433). Outros relatos revelam a luta diária com os sintomas da EM pelo escritor britânico WNP Barbellion (1889-1919) (LANDTBLOM *et al.*, 2010). Alguns escritores como Charles Dickens usava de personagens fictícios para documentar distúrbios neuroinflamatórios em seus romances (BRAIN, 1955; PETZOLD, 2013). Em 1866, foi publicada, pela primeira vez, uma série de artigos coerentes sobre “La sclerose en plates” por Jean Martin Charcot, considerado “Pai da Neurologia” do hospital La Salpêtrière em Paris. Posteriormente, Charcot fez correlações clínico-patológicas precisas da doença, enfatizando a frequência, apresentando pressupostos sobre a fisiopatologia e especulava por um tratamento eficaz. Isso levou ao primeiro critério para o diagnóstico para a EM, nomeado a tríade de Charcot: nistagno (oscilações oculares involuntárias, rítmicas e repetitivas de um ou ambos os olhos), ataxia (falta de coordenação dos movimentos de diferentes partes do corpo) e disartria (dificuldade de articulação da fala causada por motivos neurológicos) (CHARCOT, 1868 *apud* MILO; MILLER, 2014). Pierre Marie sucessor de Charcot, em 1884 sugeriu a etiologia infecciosa da EM, que ainda até os dias atuais é a mais aceitável (CHARCOT, 1886).

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença do sistema nervoso central com grande frequência em adultos jovens, apresentando-se de forma crônica devido à desmielinização do axônio na qual há destruição da bainha de mielina e reação inflamatória (ROWLAND, 1997; AL-OMAISHI; BASHIR; GENDELMAN, 1999) . A doença apresenta períodos variáveis de piora e melhora, onde resulta em um comprometimento e déficits neurológicos e evolui para incapacidade (DE ALENCAR SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2016).

Segundo o *Atlas Multiple Sclerosis International Federation* (2020), existem cerca de 2,8 milhões de pessoas vivendo com EM em todo o mundo (Figura 1). Sendo essa uma doença não contagiosa ou herdada diretamente, alguns relatos ao redor do mundo identificaram fatores que podem eventualmente ajudar a compreender a causa a doença, tais



MCLAUGHLIN, 2017). Segundo Oliveira *et al.* (2019), fatores genéticos, ambientais e epigenéticos têm um papel causal na EM e interação com fatores de risco modificáveis.

Em estudos com gêmeos, a influência genética na EM é claramente observada, sendo a taxa de concordância para EM em gêmeos monozigóticos de 30%, em contrapartida com 5% para gêmeos dizigóticos. Quanto ao grau de parentesco, o risco de desenvolver EM em familiares de 1º grau é cerca de 1 em 40, o que é 20 vezes maior do que na população em geral. Para familiares em 2º grau, o risco ocorre de 1 em 100, ainda cerca de 10 vezes maior do que na população geral (WILLER *et al.*, 2003). Membros de uma família, não relacionados geneticamente, que vivem no mesmo ambiente, apresentam o mesmo risco da população geral.

O fator genético mais fortemente associado ao risco de desenvolver EM está nos alelos do sistema HLA da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humana, localizada no cromossoma 6 (COMPSTON; COLES, 2008). Apesar das evidências, isso demonstra que o fator genético é um fator considerável para a EM, ilustrado por estudos de associação de genoma que encontraram vários genes com susceptibilidade para EM, mas com efeito modesto (COMPSTON; COLES, 2008).

O aumento do risco de EM também é associado aos níveis séricos baixos de vitamina D. A possível relação da latitude observada na história natural da EM pode ser consequência dos níveis baixos de vitamina D, o que é frequentemente observado em populações de regiões com pouca exposição solar. A vitamina D parece ter um efeito imunomodulador em modelos experimentais, mas na EM ainda não está totalmente elucidado (MUNGER *et al.*, 2006).

Sendo assim, a EM é considerada uma doença multifatorial sendo impossível estimar o risco do desenvolvimento da doença usando com base apenas a susceptibilidade genética isoladamente (MUNGER *et al.*, 2006), sendo mais provável que a doença se desenvolva em populações geneticamente predispostas associadas a determinadas exposições ambientais (ABREU *et al.*, 2012).

### 2.1.3 Fisiopatologia

Para ter uma compreensão da fisiopatologia da EM, existem fatores essenciais que devem ser observados: estresse oxidativo, níveis de vitamina D, disfunção mitocondrial, hormônios sexuais e hormônios da tireoide. Estes possuem um papel direto da etiopatogênese da EM e efeito modulador em outros aspectos da doença (TOBORE, 2021).

Na EM vários defeitos foram identificados na autotolerância. Na tolerância central observou-se uma disfunção da produção tímica de células T antígenos-específicas com alterações nos receptores de células T favorecendo reações autoimunes (WUCHERPFENNIG *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2011), além de acontecer a involução prematura do timo resultando em uma exportação reduzida de células T reguladoras virgens, o clone T regulador totalmente supressor (HAAS *et al.*, 2007). Na tolerância periférica a falha está ligada a moléculas coestimuladoras, bem como mecanismos transcricionais e epigenéticos (GONSETTE, 2012).

Na EM a degeneração axonal e a destruição da bainha de mielina são responsáveis por várias lesões dispersas no SNC, com predileção para os nervos ópticos, medula espinhal e substância branca periventricular (KLEFBECK; NEDJAD, 2003). Essas lesões espalham-se no tempo e no espaço, resultando em déficits neurológicos de curso variável (UNPHRED, 2004). As lesões iniciais no cérebro humano com EM são caracterizadas por tumefação, vacuolização, fragmentação e separação da mielina do axônio, grande afluxo de micróglia e macrófagos sendo esses responsáveis pela degradação enzimática da mielina, fagocitose e apoptose de oligodendrócitos. Algumas áreas possuem maior atividade inflamatória, destruição ativa da mielina, remielinização e proliferação de oligodendrócitos a partir de células precursoras; os axônios no início mostram lesões mínimas, mas a longo prazo são destruídos (FRANKLIN; FFRENCH-CONSTANT, 2008).

A placa de desmielinização em qualquer região da substância branca do SNC é a lesão fundamental, apresentando extensão variável. Essa placa possui características nítidas, como uma consistência elástica firme de coloração rósea por ser mais recente e posteriormente acinzentada ao exame a fresco, próxima às superfícies ventriculares e, em geral, é limitada pelo corpo caloso e núcleo caudado, na região dorsolateral (LOPES *et al.*, 1987).

Cerca de 5-10% da propagação saltatória ao longo do axônio é comprometido pela desmielinização. Isso ocorre devido à redução dos canais de sódio internodais, o que configura a base fisiológica de grande parte das manifestações clínicas da doença (SCOLDING; FRANKLIN, 1998). Há mais de um século, a neurodegeneração, dano axonal e/ou neuronal tem sido relatado como componente da EM (CHARCOT, 1886), sendo fundamental a identificação de neurônios, células gliais e padrões de mielina na EM e nos modelos experimentais da doença (VIEGAS, 2009).

A presença de infiltrados inflamatórios multifocais (células T, células B e macrófagos) no SNC é outro marcador histopatológico do SNC associado à degradação de mielina, dos oligodendrócitos e dos axônios, assim como astrogliose reativa e ativação da

microglia (FROHMAN; RACKE; RAINE, 2006; MUNGER et al., 2006). O caráter autoimune da doença é indicado por várias evidências que estariam ligadas e mediadas por linfócitos T reativos contra um ou mais antígenos que estão presentes na mielina, tais como a proteína básica da mielina (MPB), proteína proteolípídeo (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG) e a glicoproteína associada ao oligodendrócito (MOG). A modulação ou determinação da reação autoimune seria determinada por fatores genéticos e por infecções virais adquiridas na infância, embora não se tenha claramente como ocorre esta interação hipotética entre determinantes genéticos, imunológicos e ambientais (KRISHNAMOORTHY; HOLZ; WEKERLE, 2007).

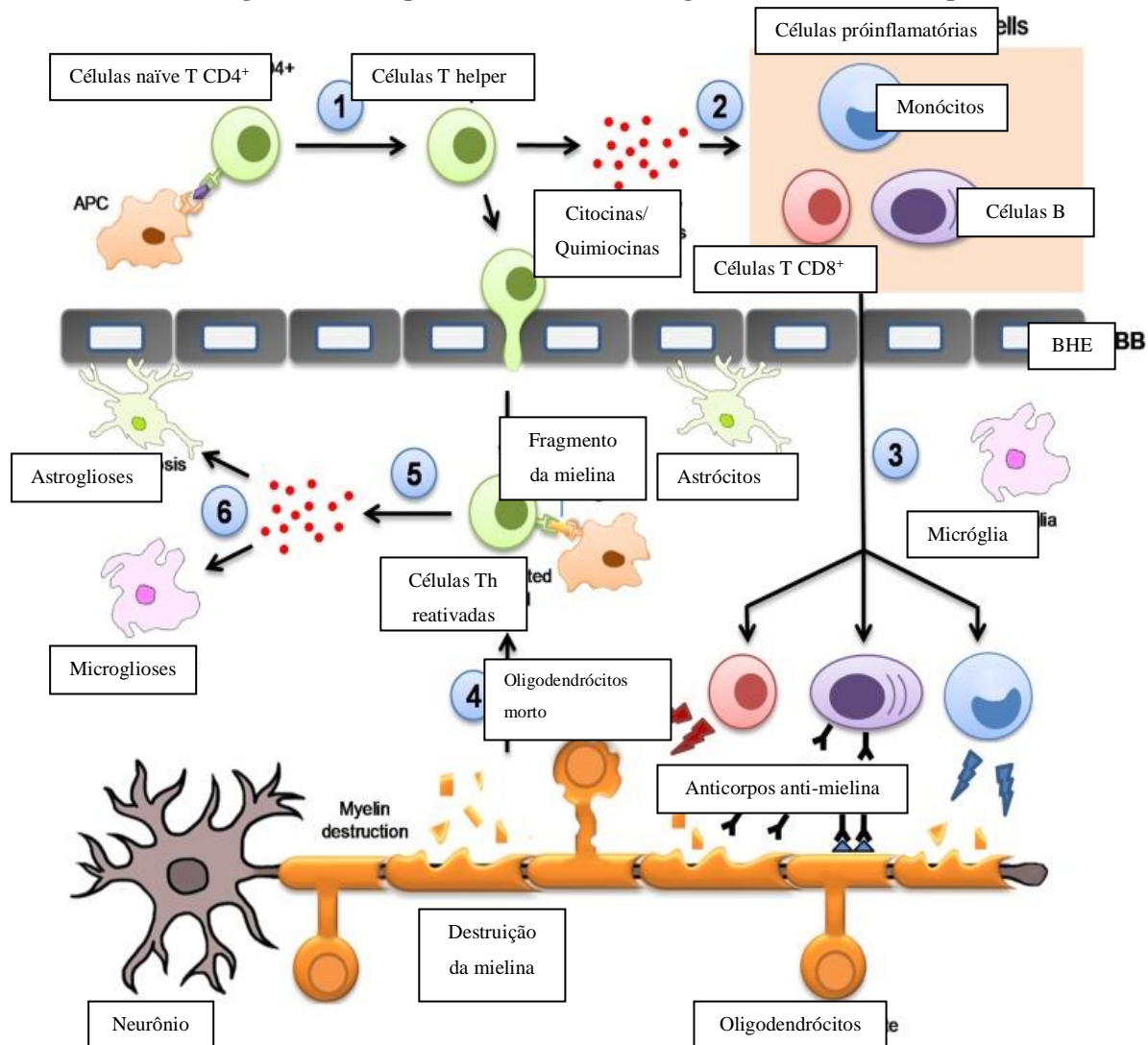
Embora algumas células possam cruzar a barreira hematoencefálica intacta, o acesso ao SNC pelas células T ativadas ocorre apenas após a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE). Algumas moléculas facilitam a entrada das células T como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1), E-selectina e a metaloproteinase 9 (MMP-9) (PICCIO *et al.*, 2002). Quando as células T CD4+, as células T CD8+ predominam e expandem-se no SNC, essas têm papel relevante na lesão de mielina e de oligodendrócitos, devido à interação com o MHC de classe I presente em oligodendrócitos, corpos neurais e axônios (VIEGAS, 2009).

Apresentando como uma doença de origem heterogênea (clinicamente, terapêuticamente e imunologicamente) a Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória causada por células T que conseguem causar a ruptura da barreira hematoencefálica (WILLING *et al.*, 2018). A homeostase do SNC é mantida principalmente pela BHE através do controle do tráfico de células para o sistema nervoso central (SNC). Demonstrando a importância da BHE na patogênese precoce da inflamação do SNC, pois células endoteliais da BHE induzem a diferenciação de células dendríticas CD209 e, posteriormente secretam IL-12p70, TGF- $\beta$  e IL-6 induzindo assim a diferenciação entre células naive em subtipo T helper 1 (Th1) ou Th17 (IFERGAN *et al.*, 2008).

Em doenças imunomediadas como a EM, as células T virgens se diferenciam em células do subtipo Th17 produtoras de IL-17, uma citocina pró-inflamatória que participa ativamente na manutenção de um ambiente inflamatório sistêmico crucial para a gênese da inflamação imunomediada envolvida na indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE) e na fisiopatologia da EM (DONG, 2009). Células Th17 têm um papel crucial na patogênese da EM, devido ao seu potencial em iniciar e manter o ataque imunológico na EM (BALASA *et al.*, 2018).

Nesta doença, a resposta observada pode ser do subtipo Th1, envolvendo a participação de linfócitos T CD4 e CD8, macrófagos e micróglia ativados, tendo assim um aumento da expressão de CD45, antígenos da classe II do MHC, interleucinas IL-1 e IL-12, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (Figura 2). Embora nas lesões em fase inicial da doença se observe a presença de macrófagos e microgliócitos, não se sabe se a perda da mielina e de oligodendrócitos que ocorre nesta fase resultaria de injúria não específica por metaloproteinases, citocinas, espécies reativas de oxigênio, e óxido nítrico. Na gênese das lesões na EM, há evidências da participação da resposta imunológica humoral, embora não se saiba se esse seria um fenômeno primário ou secundário (LALIVE *et al.*, 2006; LUCCHINETTI *et al.*, 2000; LUTTEROTTI; BERGER; REINDL, 2007).

**Figura 2 – Principais mecanismos imunológicos da Esclerose Múltipla**



Fonte: Redfern (2021). O início acontece quando as células T CD4<sup>+</sup> autorreativas são ativadas na periferia por células apresentadoras de antígenos (APC) que apresentam, em conjunto com moléculas do MHC de classe II, antígenos semelhantes aos sintetizados pelo SNC. (1) Essa interação ativa a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> naive em células T helper CD4<sup>+</sup> (Th). (2) Após a ativação, Th produz interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), uma citocina

responsável por recrutar células T CD8+, células B e monócitos na periferia. (3) Essas células pró-inflamatórias migram para a barreira hematoencefálica (BHE) e passam para o SNC. Dentro do cérebro, as células B plasmáticas produzem autoanticorpos contra autoantígenos do SNC, contribuindo para danos à bainha de mielina. Este processo é agravado quando as células T CD8+ citotóxicas infiltradas atacam os oligodendrócitos causando sua destruição e morte neuronal. Os monócitos, por outro lado, aumentam a resposta inflamatória local, liberando citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para a desmielinização por meio da fagocitose da mielina. (4) Paralelamente, células T CD4+ infiltradas são reativadas após interação com fragmentos de mielina apresentados por APCs residentes, o que favorece (5) liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, (6) astrogliose e microgliose.

Em pacientes com EM, já foi evidenciado no líquido cefalorraquidiano (LCR) um aumento de imunoglobulinas, especialmente IgG, de anticorpos contra glicoproteínas de oligodendrócitos e mielina e de componentes do complemento ativado (LALIVE *et al.*, 2006; LUCCHINETTI *et al.*, 2000; LUTTEROTTI; BERGER; REINDL, 2007).

Assim na desregulação imune da EM é atribuído às células Th17 um alto potencial patogênico com relação às células Th1 devido a algumas características das células Th17 como: maior capacidade proliferativa, susceptibilidade reduzida a supressão, maior plasticidade de função, expressão de uma molécula de adesão de células de melanoma (MCAM) ou CD146 e maior eficiência na migração pela BHE (PASSOS *et al.*, 2016; BUTCHER; ZHU, 2018).

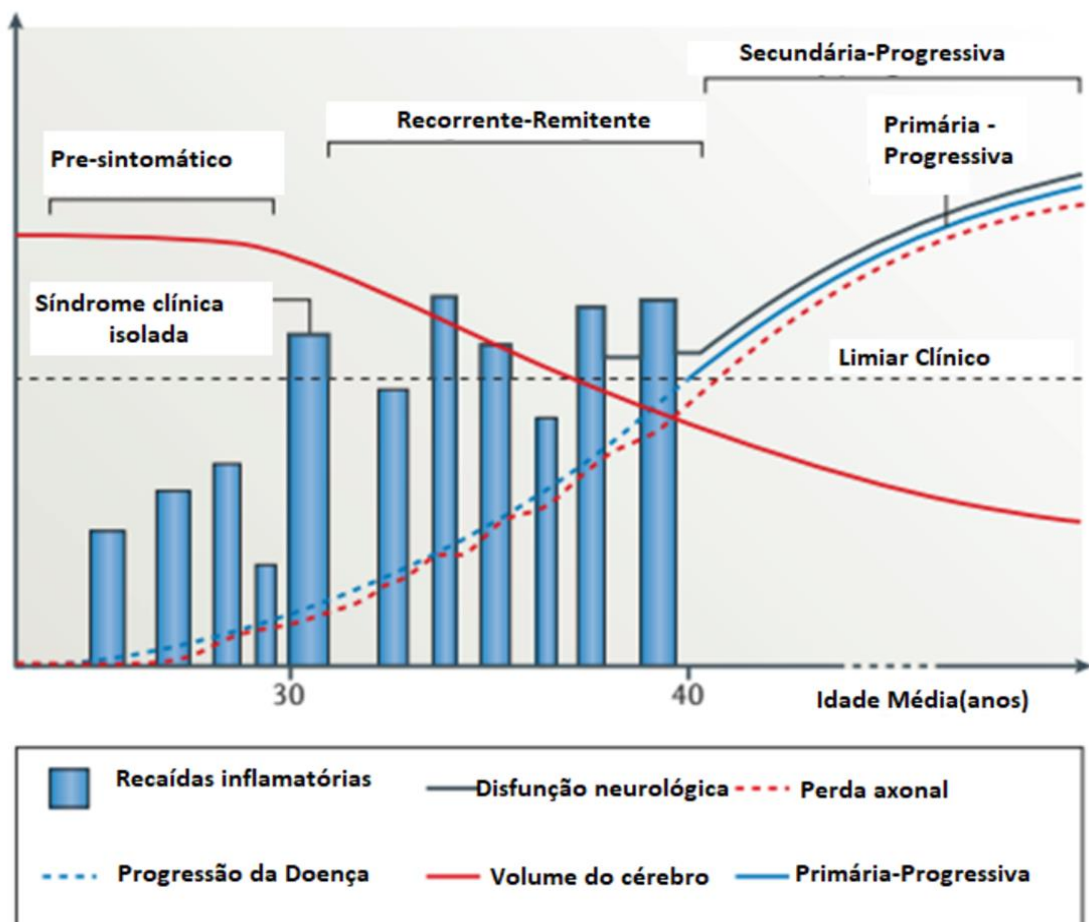
Clinicamente e patologicamente, a EM apresenta variáveis que refletem em vias para o dano tecidual (TOBORE, 2021). As inflamações, desmielinização e degeneração dos axônios são manifestações clínicas devido aos danos causados pelos principais mecanismos desencadeadores da doença (COMPSTON; COLES, 2008). Pressupõe-se que a resposta autoimune que desencadeia a superexpressão de citocinas em indivíduos com EM, tais como IL-1, IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$ , TNF-alfa e TNF- $\beta$ , induz a expressão de moléculas específicas na membrana das células do SNC e ativam a função fagocítica das células da micróglia (REZENDE; ARRUDA, 1998). Assim dependendo da área afetada do SNC a EM pode aparecer como ataques episódicos ou como uma progressão contínua (DUFFY; LEES; MOALEM-TAYLOR *et al.*, 2014), afetando a saúde mental e causando distúrbios musculoesqueléticos que vem a contribuir para a redução da qualidade de vida das pessoas acometidas pela doença (LO *et al.*, 2021).

A apresentação da EM tem diferentes formas clínicas, desde formas silenciosas por toda a vida até formas bastante sintomáticas e severas (Figura 3). A EM é classificada de acordo com o surto ou progressão em: Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente (EMRR), que é caracterizada por surtos que podem deixar sequelas ou não, não sendo observado a progressão aparente da doença entre os outros surtos; Esclerose Múltipla Secundária Progressiva (EMSP), caracterizada pela fase após o início de EMRR, onde se nota progressão



da doença, com ou sem recidivas; Esclerose Múltipla Primária progressiva (EMPP), caracterizada pelo agravamento progressivo da função neurológica desde o início dos sintomas; e Síndrome Clinicamente Isolada (CIS), que é a primeira manifestação clínica que sugere características de desmielinização inflamatória de EM (COSTELLO *et al.*, 2019; JACQUES; LUBLIN, 2015).

Figura 3 – Formas Clínicas da Esclerose Múltipla (progresso, idade e disfunções)



Fonte: Dendrou, Fugger e Friese (2015).

#### 2.1.4 Tratamentos

Nas últimas duas décadas, o tratamento da EM teve grande evolução, devido aos medicamentos que diminuem os surtos e /ou a evolução da doença. Esses medicamentos são conhecidos como imunomoduladores e imunossupressores (BRASIL, 2021). O tratamento da EM pode ser complexo, envolvendo condutas medicamentosas e não medicamentosas

juntamente com a ação coordenada por uma equipe multiprofissional de saúde (BRASIL, 2021).

A melhoria clínica, o aumento da capacidade funcional, a redução de comorbidades e a atenuação de sintomas são os objetivos do tratamento medicamentoso. Os glicocorticóides são utilizados para tratar os surtos e mostram benefício clínico a curto prazo, ao reduzir a intensidade e duração dos episódios agudos (GAJOFATTO; BENEDETTI, 2015). No curso da doença, as terapias modificadoras visam a redução das células imunogênicas circulantes, supressão da adesão destas ao epitélio e, conseqüentemente, a redução da sua migração para o parênquima e a resposta inflamatória decorrente (TABANSKY *et al.*, 2015).

Entre os medicamentos utilizados e aprovados pela ANVISA para uso no Brasil, até abril de 2020, no protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da EM, temos: teriflunomida, fumarato de dimetila, fingolimode, natalizumabe, betainterferona e acetato de glatirâmer (BRASIL, 2021). No entanto, os tratamentos com a EM se destacam pelo alto índice de reações adversas, afetando diretamente a qualidade de vida dos pacientes bem como o alto custo associado ao seu tratamento. No Brasil, o tratamento da Esclerose Múltipla tem um gasto médio anual de aproximadamente 38 mil reais por cada paciente. Mas dependendo da gravidade da doença e perspectiva adotada, os custos podem variar de 6500 reais a 157 mil reais (SILVA *et al.*, 2016). O gasto com terapias modificadoras da doença para o tratamento da Esclerose Múltipla ocupou, em 2014 e 2015, o oitavo lugar de maiores despesas com medicamentos nos EUA, segundo o relatório publicado pelo Instituto Quintiles IMS em 2015 (AITKEN *et al.*, 2016).

A teriflunomida é o medicamento indicado como primeira opção para o tratamento de pacientes com esclerose múltipla remitente–recorrente (EMRR). É um imunomodulador, com propriedades anti-inflamatórias, que inibe seletivamente e reversivelmente a enzima mitocondrial di-hidro-orotato desidrogenase. Essa enzima ocupa a quarta posição da via biossintética da pirimidina, ocasionando, conseqüentemente, a inibição de nova síntese destas substâncias e um efeito citostático subsequente na proliferação de linfócitos T (GENZYME A SANOFI COMPANY, 2016; KLOTZ *et al.*, 2019). Porém, em pacientes com EM, o mecanismo de ação exato para efeitos terapêuticos ainda é desconhecido e as evidências sugerem que envolve a redução no número de linfócitos ativadas capazes de migrar para o SNC (BRASIL, 2017; GENZYME A SANOFI COMPANY, 2016).

A escolha da teriflunomida para o tratamento de pacientes com EMRR foi baseada em evidências disponíveis da sua segurança e sua eficácia comparada às atuais

opções de primeira linha terapêutica da EMRR. Segundo o relatório de recomendação da Conitec (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde), não foram encontradas diferenças significativas em relação à eficácia e à segurança entre teriflunomida e as interferons betas (IFN- $\beta$ ) ou o acetato de glatirâmer (SPENCER *et al.*, 2015).

O tratamento com Teriflunomida pode levar a reações adversas como: cefaleia, diarreia, náusea, alopecia, alterações no valor da pressão arterial, diminuição de leucócitos, elevação das enzimas hepáticas, além de contribuir na piora de doenças pré-existentes como a doença intersticial pulmonar (BRASIL, 2017; GENZYME A SANOFI COMPANY, 2016).

O fumarato de dimetila (DMF) é um medicamento de primeira linha onde o mecanismo de ação pelo qual exerce efeito terapêutico na EM não é totalmente compreendido. A sua eficácia clínica tem sido atribuída, principalmente, por ter um efeito modulador nas células T. Foi constatado que o DMF diminuiu o número de células T circulantes, com uma redução desproporcional do subconjunto CD8<sup>+</sup>. Corroborando esses efeitos diretos nas células T, estudos indicam que o DMF contribui para a redução da atividade pró-inflamatória das células apresentadoras de antígeno, como os monócitos e as células dendríticas (KORNBERG *et al.*, 2018; SCHULZE-TOPPHOFF *et al.*, 2016).

O tratamento feito com fumarato de metila pode levar a rubor e eventos gastrointestinais com incidência  $\geq 10\%$ , e outras reações com incidência entre 1% e 10 % como leucopenia, linfopenia, sensação de queimação, fogaço, vômito, gastrite, prurido, proteinúria e aumento de transaminases/aminotransferases (BARBUGIANI, 2015; BRASIL, 2017).

O acetato de glatirâmer é um fármaco de primeira linha no tratamento da Esclerose Múltipla Recorrente Remitente (EMRR), tendo uma ação imunomoduladora e neuroprotetora. Sabe-se que o tratamento com o acetato de glatirâmer induz o aumento nos níveis de citocinas com atividade anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF $\beta$  (fator  $\beta$  de transformação de crescimento), além de uma redução nos níveis de TNF- $\alpha$  (com atividade pró-inflamatória) (RACKE; LOVETT-RACKE, 2011).

O tratamento com acetato de glatirâmer pode levar a eventos adversos como gripe, infecção, ansiedade, depressão, vasodilatação, dispneia, náusea, rash cutâneo, artralgia, dorsalgia, astenia, dor torácica com uma incidência  $\geq 10\%$ . Entre os efeitos cuja incidência gira em torno de 1% e 10%, podemos destacar o aumento de peso, tremor, distúrbios oculares, palpitações, taquicardia, vômitos, distúrbios da pele, calafrios, edema de face e candidíase vaginal (BRASIL, 2017; TEVA, 2014).

Os interferons (IFN) são citocinas que podem ser divididas em 3 classes - tipo 1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), tipo 2 ( $\gamma$ ) e tipo 3 ( $\lambda$ ), possuindo funções antiproliferativas, imunomoduladoras e antivirais (KNUTH *et al.*, 2019). Os interferons do tipo 1 podem ser produzidos pelas células dendríticas, como o interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), e também pelos fibroblastos, como o interferon beta (IFN- $\beta$ ) (REDER; FENG, 2014). Os interferons beta estão incluídos nos medicamentos de primeira linha para o tratamento da EMRR, e são disponibilizados pelo Sistema único de Saúde, incluindo IFN- $\beta$ -1a e IFN- $\beta$ -1b (BRASIL, 2021).

O uso dos interferons pode levar a efeitos adversos, tais como síndrome gripal (febre, calafrios, mialgia, indisposição), distúrbios psíquicos, cefaleia, dor abdominal, incontinência urinária, alterações menstruais, erupção cutânea até reação no local de injeção (BAYER, 2016; BIOGEN, 2017). O custo mensal do tratamento por pessoa varia de R\$3.660,00 a R\$4.472,00 (GANDRA, 2019).

O natalizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado, IgG4, que atua impedindo a migração de células através da barreira hematoencefálica por se ligar à integrina alfa 4 beta 1 (VLA-4) presente nos linfócitos. Isso vem a impedir a interação com a molécula de adesão VCAM-1 expressa pelo endotélio vascular (ELICES *et al.*, 1990). Portanto, ele atua como um inibidor seletivo da migração de linfócitos através da barreira hematoencefálica (HORGA; TINTORÉ, 2011), sendo normalmente prescrito quando há falha terapêutica ou toxicidade associada (intolerância, hipersensibilidade ou outro evento adverso) aos medicamentos de primeira e segunda linha em pacientes com EMRR. Além disso, este medicamento passa a ser primeira opção de tratamento em EMRR quando se observa que a doença encontra-se em alta atividade (ENGELHARDT; KAPPOS, 2008).

O uso do medicamento natalizumabe pode levar a reações adversas como: náusea, urticária, tontura, dor de cabeça, rigidez associada às infusões, artralgia, fadiga, gastroenterite, vaginite, depressão, desconforto abdominal e diarreia. Estas reações apresentam uma incidência  $\geq 10\%$  nos pacientes que fazem uso do medicamento. Lesões hepáticas e hiperbilirrubinemia também são descritos na literatura e o monitoramento mensal do hemograma do paciente se faz necessário devido a sérios casos relatados de anemia hemolítica (BIOGEN, 2018).

O fingolimode é um análogo estrutural sintético da esfingosina 1-fosfato (SOBIERA, 2011). Altamente lipofílico, trata-se de um pró-fármaco que é metabolizado *in vivo* pela enzima esfingosina quinase no metabólito ativo fingolimode-fosfato, um modulador não seletivo dos receptores de esfingosina 1-fosfato. A redução da atividade inflamatória e as respostas autoimunes específicas da mielina que ocorre com o uso do fingolimode se deve ao

bloqueio da migração de linfócitos T dos linfonodos para o SNC (NOVARTIS, 2015; VOLPI *et al.*, 2019).

O tratamento com fingolimode pode levar a infecções, edema macular e bloqueios atrioventriculares transitórios. Dentre as reações adversas com uma incidência  $\geq 10\%$ , pode se observar cefaleia, aumento das enzimas hepáticas, diarreia, tosse, gripe e dor nas costas (NOVARTIS, 2015). Diante dos inúmeros efeitos colaterais provocados pelos medicamentos sintéticos usados atualmente para a EM, ver-se-á necessidade da busca por novos medicamentos alternativos naturais (MOJAVERROSTAMI *et al.*, 2018).

Embora todos os fármacos citados anteriormente evidenciem efeitos promissores no tratamento da EM, eles são ineficazes na cura do paciente. Além disso, estes apresentam um problema fundamental que é a sua atuação não seletiva nas células do sistema imune, o que desencadeia graves efeitos colaterais como leucoencefalopatia multifatorial progressiva, erupções cutâneas, aumento das taxas de infecções e úlceras, além do tratamento ter longa duração e com um custo alto. Para os pacientes acometidos pela EM, essas variáveis acarretam a pouca adesão ao tratamento (JONES ; COLES, 2010). Assim, a busca por alternativas terapêuticas eficazes, menos custosas e com menos efeitos adversos, se faz necessária.

## 2.2 Plantas medicinais

A medicina popular, com o uso de plantas medicinais, é uma prática milenar na qual a população interioriza os saberes, tendo esse conhecimento como única forma de tratamento e cura de doenças, para muitas comunidades e grupos étnicos (LINHARES *et al.*, 2014). Os conhecimentos relativos à utilização das plantas medicinais são repassados de maneira informal por familiares, amigos e vizinhos, sendo os mais idosos seus detentores, que os vão transmitindo para os mais jovens. Essa função no futuro será um de seus afazeres e uma das suas necessidades (LINHARES *et al.*, 2014).

No Brasil os estudos sobre etnobotânica, fitoterápicos e o uso de plantas medicinais têm crescido consideravelmente, aparecendo estudos multidisciplinares, destacando-se a união da farmacologia com a fitoquímica (VALE; PEREIRA JUNIOR; RODRIGUÊS, 2018; LIMA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2013).

Entre os anos de 1940 e 2014, aproximadamente 49% das moléculas aceitas pela FDA (*US Food and Drug Administration*) eram de produtos naturais, considerando assim a

importância e relevância de estudos para a comprovação de novos produtos naturais extraídos de plantas para novas terapias (NEWMAN; CRAGG, 2016).

### 2.2.1 *Anadenanthera colubrina*

*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, popularmente conhecida como Angico, é encontrada em diversas regiões do Brasil exceto Rio Grande do sul, Santa Catarina, Espírito Santo, Alagoas e toda região Norte (Figura 4). É considerada uma espécie lenhosa típica do bioma Caatinga brasileiro (SILVA *et al.*, 2019). É uma angiosperma da família Fabaceae, uma família que se apresenta com a maior diversidade e número de espécies na flora brasileira, e está entre as três famílias mais diversas em todos os domínios fitogeográficos do Brasil. Incluindo 795 gêneros e quase 20.000 espécies, sendo cerca de 50% dessas consideradas endêmicas do país (LEWIS *et al.*, 2005; LPWG, 2017).

**Figura 4 – Distribuição fitogeográfica da *Anadenanthera colubrina* no Brasil**



Fonte: Morim (2020). As regiões coloridas indicam as áreas com presença de espécies de *A. colubrina*.

Apresenta-se como um arbusto ou árvore, de 3 a 25 m de altura, podendo chegar a um diâmetro de até 75 cm (Figura 5). Suas folhas são compostas bipinadas, paripenadas com raque na folha com até 20 cm de comprimento. Tendo flores brancas ou amareladas reunidas em panículas com frutos. A floração ocorre de novembro a dezembro e a frutificação de

janeiro a março (MORIM, 2020).

**Figura 5 - Representação da *Anadenanthera colubrina* (árvore completa e partes aéreas – folhas e frutos)**



Árvore

Folhas e frutos

Fonte: Arquivo pessoal.

É uma espécie botânica dentre as mais citadas popularmente pelos residentes onde a espécie é endêmica, como sendo uma espécie com propriedades medicinais para o tratamento de afecções pulmonares e vias respiratórias como gripe, resfriado, tosse e antidiarréico (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

O uso dessa espécie como planta medicinal é comum. Pesquisas recentes com a *A. colubrina* vêm demonstrando propriedades terapêuticas promissoras em várias vertentes, como: inflamações em geral (DANIEL *et al.*, 2014), antifúngica (LIMA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2019), antiproliferativa (LIMA *et al.*, 2014), anti-inflamatória (GUARNEIRE *et al.*, 2021; JUNIOR *et al.*, 2021), antioxidante (JUNIOR *et al.*, 2021) e anti-HIV (MAIA *et al.*, 2021).

A folha e a casca desta espécie lenhosa são secas e preparadas para uso medicinal de diferentes maneiras (MAGALHÃES *et al.*, 2021). Tendo um amplo uso tanto no cenário da medicina popular como no cenário comercial (madeira resistente a cupins, engenharia civil, objetos para uso doméstico, entre outras) hoje ela está na lista de plantas medicinais importantes para a conservação (VIANA *et al.*, 2014).

Dentre as partes da planta utilizadas para fins terapêuticos a casca é utilizada pela população nordestina brasileira em chás, infusões, decocções, tinturas e xaropes para curar a gonorréia, asma, doença brônquica, dor de garganta, tosse, problemas uterinos, reumatismo, inflamação em geral e infecção dos ovários (ALMEIDA; SILVA, 2020; SOUSA *et al.*, 2021).

Em estudos sobre os aspectos etnofarmacológicos do uso tradicional da *A. colubrina*, tem-se o destaque o uso em problemas respiratórios e inflamatórios (DELICES *et al.*, 2023).

Em contorção abdominal induzida por ácido acético em modelo murino e sinovite induzida por carragenina, administraram-se doses de 100, 200 e 400 mg/kg do extrato aquoso da casca da *Anadenanthera colubrina* em ambos os estudos. Apresentando uma redução das contorções abdominais e da infiltração de leucócitos, observando as atividades antiinflamatória e antinociceptiva (sensação de dor) (SANTOS *et al.*, 2013).

Com extrato hidroalcoólico da casca em doses 100, 200 e 400 mg/kg verificou-se a atividade antiinflamatória em edema de pata (LIMA *et al.*, 2020). Em um estudo feito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa com o extrato etanólico das folhas em dosagem de 500mg/kg para avaliação histológica em edema de pata, observou-se uma redução da presença de leucócitos e em ensaios *in vitro* foi observada a inibição da produção do óxido nítrico e a liberação de TNF- $\alpha$  (JUNIOR *et al.*, 2021).

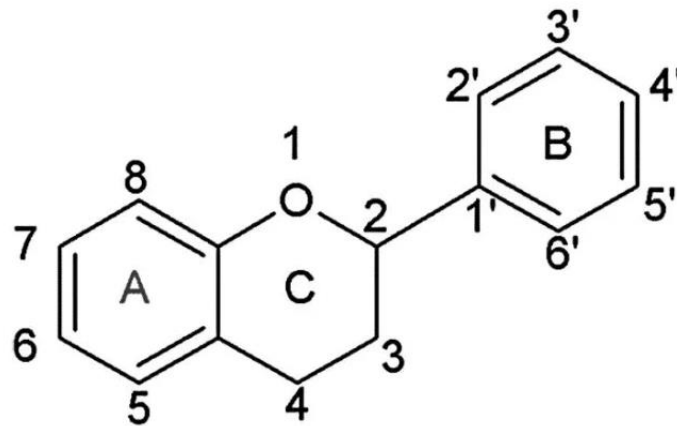
A fitoquímica da *A. colubrina* demonstra que no extrato de sua casca contém flavonoides, fenóis, saponinas, esteroides, taninos, triterpenos e xantonas. E as atividades biológicas da *A. colubrina* se devem, pelo menos em parte, à variedade de metabólitos secundários presente na sua composição (SANTOS *et al.*, 2013).

Dentre os compostos encontrados no extrato de casca da *Anadenanthera colubrina* citados anteriormente, os compostos fenólicos totais ganham destaque devido ao seu alto teor, incluindo principalmente os flavonoides. Os compostos fenólicos presentes nas cascas de *Anadenanthera colubrina* têm sido valorizados como suplementos bioativos, os quais possuem um grande potencial na rota de valorização do seu extrato (MOTA *et al.*, 2017). Os flavonoides constituem um dos principais tipos de compostos fenólicos, com ampla variedade estrutural e uma gama de atividades, incluindo propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que justificam o seu uso no tratamento de diversas doenças com componente inflamatório como, por exemplo, câncer, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (LEE *et al.*, 2009).

O que confere a atividade inflamatória aos flavonoides está relacionado, em partes, com a facilidade que a sua estrutura química tem em interagir com sistemas enzimáticos envolvidos em diversos mediadores inflamatórios. A estrutura básica de um flavonoide (figura 6) consiste em um cromona (anéis A e C) ligados ao C1' do anel B que proporciona seus benefícios extremamente bioativos (ÇELIKA; KOSAR, 2012).

**Figura 6 - A estrutura básica dos flavonoides**





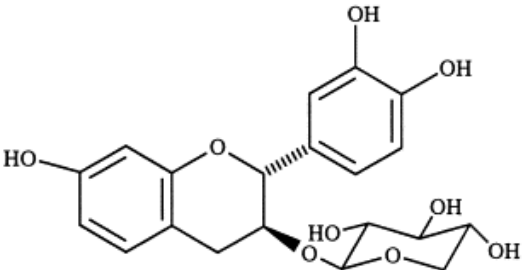
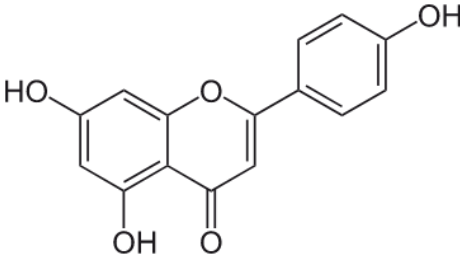
Fonte: Panche, Diwan e Chandra (2016). A estrutura básica dos flavonoides é composta pelo anel A e C (cromona) ligado ao carbono 1' do anel B(fenil).

Estudos recentes demonstraram que os mediadores envolvidos na inflamação, podem ser controlados por flavonoides que atuam na inibição de enzimas reguladoras ou fatores de transcrições. Os flavonoides apresentam também um potencial antioxidante que vem atenuar a fibrose ou o dano tecidual. Assim sendo, vários estudos *in vivo* e *in vitro* relatam o potencial dos flavonoides na inibição do desenvolvimento de doenças inflamatórias (LEE *et al.*, 2009; MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019).

O aumento no potencial antiinflamatório conferido aos flavonoides pode ser observado principalmente quando na molécula do flavonoide o carbono C-3' (anel B) ocorre uma hidroxilação e um anel B de catecol no C-3'-OH e C-4'-OH (BAYAT *et al.*, 2021). E dentre os flavonoides isolados da *A. colubrina* todos apresentam essa hidroxilação observada no C-4' como podemos observar na tabela 2 (WEBER, 2011).

**Tabela 1 - Compostos flavonoides isolados da *Anadenanthera colubrina*, adaptado de WEBER, 2011**

Anadanthoflavona	
------------------	--

Flavonoides	Ananthoside	
	Apigenina	

Fonte: Adaptado de Weber (2011).

### 2.3 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

Os modelos pré-clínicos são utilizados na busca de tratamento e cura de diversas doenças, e tem grande relevância devido às poucas alternativas que reproduzem resultados similares em seres humanos. Na maioria das vezes, ensaios *in vitro* são inicialmente realizados e, só após uma triagem, as melhores moléculas são transferidas para a escala *in vivo*. Por conseguinte, os animais são o início para investigações dos mecanismos de ações farmacológicas e de possíveis efeitos colaterais. Alguns desses estudos trouxeram informações relacionadas à imunologia, fisiologia, cura do câncer, Alzheimer, síndrome da imunodeficiência adquirida entre outros (PEREIRA *et al.*, 2020).

Em 1933 houve a descrição do primeiro modelo de resposta autoimune a partir da imunização com mielina do SNC por Thomas Rivers (EPPS, 2005) que utilizou repetidas injeções de extrato de cérebro de coelho em macacos Rhesus. Assim, as alterações histológicas e manifestações clínicas semelhantes a EM puderam ser reproduzidas e observadas em modelos experimentais mediante imunização com mielina ou componentes da mielina, ou por meio de transferência de linfócitos T sensibilizados (LININGTON *et al.*, 1992; BERNARD *et al.*, 1997).

Nesses modelos experimentais, o mecanismo descrito para a destruição da mielina é a resposta imunológica do tipo Th1, envolvendo linfócitos T CD4 e CD8,

macrófagos ativados, ou anticorpos antimielina que ativam o complemento e promovem fagocitose via opsonização (ZIEMSEN; ZIEMSEN, 2005).

Vários modelos animais de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) foram desenvolvidos na tentativa de reproduzir, em animais, as alterações anatômicas e comportamentais observadas na esclerose múltipla em humanos. Esses modelos têm sido usados tanto para estudar a progressão e/ou desenvolvimento da doença quanto para avaliar o potencial terapêutico de novas drogas (SLOANE; LEDEBOER, 2009). A inflamação no SNC, a desmielinização dos neurônios e as alterações motoras que estão presentes na esclerose múltipla são observadas nesses modelos ((AL-OMAISHI; BASHIR; GENDELMAN, 1999; BAXTER, 2007).

Conforme ilustrado na tabela 2 a indução da EAE feita em camundongos acontece com proteínas inteiras da mielina ou epítomos da mielina em adjuvantes, onde esses epítomos específicos são capazes de induzir diferentes manifestações da EAE conforme as diversas linhagens de camundongos (BERNARD *et al.*, 1997; DE ROSBO; MENDEL; BEN-NUN, 1995).

**Tabela 2 - Comportamento clínico de diferentes linhagens de camundongos induzidos com MOG ou peptídeos derivados de MOG**

Camundongo	Imunização	Número de injeções	Sinais clínicos/ Curso clínico	Presença de desmielinização
Biozzi (AB/H)	rMOG (domínio extracelular)	2	Moderado/Agudo	Não
	Peptídeo 1-15	2	Grave/Agudo	Não
	Peptídeo 8-22	2	Moderado/Agudo	Não
	Peptídeo 43-57	2	Leve/Agudo	Não
	Peptídeo 134-148	2	Leve/Agudo	Não
SJL/J	rMOG	2	Leve/Agudo	Não
	Peptídeo 92-106	2	Grave/Agudo	Sim
PL/J	Peptídeo 35-55	3	Grave/Crônico com surto	Sim
C57BL/6	rMOG (domínio extracelular)	1	Grave/Crônico sem remissão	Sim
	Peptídeo 35-55	2	Grave/Crônico sem remissão	Sim
	Peptídeo 35-55	1	Grave/Crônico sem	Sim

			remissão	
C3H.SW	Peptídeo 35-55	2	Grave/Crônico sem remissão	Não determinado
NOD/Lt	rMOG (domínio extracelular)	1	Grave/Crônico com surto	Sim
	Peptídeo 35-55	1	Grave/Crônico com surto	Sim

Fonte: Adaptação de Bernard *et al.* (1997).

A proteína MOG (Glicoproteína da Mielina de Oligodendrócitos) é expressa apenas no SNC e está localizada nos corpos celulares e processos de oligodendrócitos, na camada externa da bainha de mielina (KROEPFL *et al.*, 2002). Essa pertencente à superfamília das Imunoglobulinas (Ig), e possui 245 aminoácidos, sabendo-se que essa sequência de aminoácidos da MOG é altamente conservada entre roedores e humanos, com aproximadamente 89% de homologia entre as espécies (DE ROSBO; MENDEL; BEN-NUN, 1995). Tendo uma localização estratégica, é diretamente acessível a anticorpos e acredita-se ser relevante como um alvo para as respostas imunes, celular e humoral, na EM. A MOG só é encontrada no cérebro, medula espinhal e retina e só é expressa no final da mielinização, não sendo encontrada em nervos periféricos (SOSPEDRA; MARTIN, 2005). A EAE induzida por MOG pode ser melhor examinada em camundongos C57BL/6, no qual o peptídeo MOG<sub>35-55</sub> induz uma EAE crônica (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

A indução por MOG no modelo EAE foi descrito inicialmente em ratos Lewis por LINNINGTON e colaboradores (1984), apresentando características de processos fisiopatológicos similares ao da EM incluindo células T encefalitogênicas e desmielinização com dano axonal (LINNINGTON *et al.*, 1993; STORK *et al.*, 1998; TSUNODA, 2006). ADELMANN *et al.* (1995) descobriram que o epítipo com 21 aminoácidos na posição 35-55 da proteína MOG era reconhecido pelo sistema imune. A linhagem C57BL/6 foi susceptível ao peptídeo MOG<sub>35-55</sub> com sinais clínicos a partir do 14º dia pós-indução, apresentando uma evolução crônica e inflamação mediada por células T, B e macrófagos no SNC (BERNARD *et al.*, 1997). A adesão leucocitária à microvasculatura cerebral que ocorre no 14º dia pós-indução correlaciona-se com os sinais clínicos, onde esse mecanismo está envolvido na migração celular para o SNC com participação de quimiocinas CCL2 e CCL5 (DOS SANTOS *et al.*, 2005). A tabela 2 demonstra o comportamento das linhagens de camundongos induzidos com variados tipos de peptídeos.

Modelos experimentais relevantes, com exame dos aspectos patológicos da

doença, vêm ajudando a compreender alguns mecanismos envolvidos. A obtenção de dados experimentais relacionados à gênese e evolução das alterações axonais, corticais e da substância branca como elementos envolvidos nos aspectos clínicos e da resposta terapêutica são de extrema relevância. A EM possui componentes individuais da lesão que incluem a inflamação da barreira hematoencefálica, desmielinização após a destruição direta da mielina e/ou oligodendrócitos, dano axonal, envolvimento cortical, remielinização e gliose. Esses componentes puderam ser observados dependendo da fase ou estágio clínico da lesão, no qual classicamente as lesões ativas implicam em algum grau de lesão ativa da mielina, que pode ser determinada pela presença da mesma sendo digerida em macrófagos (BRUCK *et al.*, 1995). Assim podemos verificar a relevância do processo inflamatório na esclerose múltipla e que podemos reproduzir em modelos como o EAE.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do extrato etanólico de *Anadenanthera colubrina* na modulação da resposta imune no modelo de encefalomielite autoimune experimental.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a evolução do quadro de sintomas da EAE na linhagem camundongo C57BL/6, através do peso e escore clínico dos animais;
- Quantificar os níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$  e TNF no cérebro e medula espinhal;
- Avaliar o perfil dos leucócitos no baço, linfonodo, cérebro e medula espinhal;
- Analisar o infiltrado de células leucocitárias e a desmielinização no cérebro e na medula espinhal;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e preparação do extrato etanólico de *A. colubrina* (EtAc)

A coleta do material foi feita no mês de março de 2021 na região da APA (Área de Proteção Ambiental do alto Mucuri), comunidade de Baixão (Figura 7), município de Carai – MG (lat:17.277828 long:-41.6555 WGS84). Foram coletadas as cascas do caule da árvore de *A. colubrina* usando instrumentos como podão, tesoura e facão. As amostras foram lavadas, secas em estufa a 40 °C por 2 horas e armazenadas em temperatura ambiente.

A identificação botânica foi realizada através de análises morfológicas e comparada às exsicatas de coleções virtuais botânicas brasileiras e mundiais do Herbário Virtual Re flora-2021 e o New York Botanical Garden-2021. Em seguida, o material foi registrado no SisGen sob o número de registro A5C1263.

**Figura 7 – Localização da coleta da *A. colubrina*. Região da APA, comunidade de Baixão, município de Carai-MG, local da coleta do material**



Fonte: Google Earth (2019).

Para a preparação do extrato, foi retirado a casca do caule da planta. As cascas foram devidamente lavadas e submetidas à secagem, conforme técnicas sugeridas por (OCAMPO; CEBALO; HILA, 2019). Após a secagem das cascas, as mesmas foram trituradas em liquidificador industrial e imersas em etanol P.A., utilizando 100 g do material para 400 ml de etanol, homogeneizando-os e mantendo em recipiente fechado por 48 horas. Após 48 horas, foram filtrados em bomba de vácuo e acondicionados em freezer em temperatura de – 80 °C por 24 horas. Após esse período, foram liofilizados por 48 horas e acondicionados em freezer -80 °C (Figura 8).

**Figura 8 - Preparação do extrato etanólico da *A. colubrina***



Fonte: Arquivo pessoal. Descrição: a) casca da *A. colubrina*; b) trituração das cascas; c) cascas trituradas em imersão etílica; d) filtragem; e) congelamento por 24h.; f) liofilização por 48h.

## 4.2 Delineamento dos estudos

Foi realizado um estudo experimental não clínico, no laboratório de Imunologia da FAMMUC/UFVJM, no qual foram utilizados animais de laboratório para a realização de testes de avaliação do EtAc na modulação da resposta imune do modelo EAE. Os animais foram escolhidos aleatoriamente e distribuídos em grupos, que receberam tratamentos conforme o protocolo experimental.

## 4.3 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos C57/BL6, fêmeas com 6-8 semanas, pesando entre 16-19 g, reunidos em 3 grupos de oito animais por grupo (n=8), todos procedentes do Biotério da UFMG. Os animais foram acondicionados aleatoriamente em gaiolas adequadas de polipropileno, forradas com maravalha e mantidos a uma temperatura constante 22-23 °C, com livre acesso à ração e água, no biotério da Faculdade de Medicina do Mucuri - UFVJM no *campus* do Mucuri. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, uma vez que o projeto foi submetido à apreciação e certificação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) com o intuito de atender as normas regulamentadoras. Todos os experimentos só tiveram início após a aprovação pela CEUA-UFVJM (protocolo nº 05-2021R).

## 4.4 Indução da EAE (Encefalomielite Autoimune Experimental)

Cada animal foi imunizado por via subcutânea (s.c) em cada lado da região dorsal próxima à base da cauda com 100 µg do peptídeo MOG<sub>35-55</sub> (GenOne) emulsionado em adjuvante completo de freund (Sigma®) na proporção de 1:1, suplementado com 400 µg de



*Mycobacterium tuberculosis* (H37 RA: Difco Detroit, USA). No dia da imunização e após 48 horas, cada animal recebeu 0,3 µg de toxina pertussis (Sigma) via intraperitoneal (i.p.), em PBS para cada aplicação.

**Figura 9 – Indução da EAE (encefalomielite autoimune experimental) em camundongos**



Fonte: Acervo pessoal. Todos os animais foram pesados e imunizados. A imunização aconteceu primeiramente com uma injeção subcutânea de MOG<sub>35-55</sub> (glicoproteína mielodilênolítica) e completou-se com o adjuvante de Freund (CFA), acompanhados por uma injeção de toxina pertussis intraperitoneal no dia da imunização e dois dias mais tarde.

#### 4.4.1 Tratamento com extrato etanólico de *Anadenanthera colubrina* (EtAc)

Os camundongos foram divididos em 3 grupos (n = 8 animais/ grupo): (a) EAE (induzido e não-tratado); (b) *Anadenanthera colubrina* (induzido e tratado com EtAc 200mg/kg/dia); (c) controle (não-induzido e não-tratado).

O tratamento foi iniciado no 15º dia após a indução da EAE por gavagem (v.o.) e se estendeu até o 21º dia após a indução, considerando-se o dia da indução como dia 0. O tratamento foi feito por gavagem na concentração de 200 mg/kg em 100 µl (Piao *et al.*, 2007).

#### 4.4.2 Avaliação clínica

Os camundongos foram pesados diariamente desde o dia da indução (dia 0) até o dia da eutanásia (21º dia após imunização). Os animais também foram avaliados com relação à incapacidade neurológica através da escala apresentada na tabela 3, conforme adaptado por De Paula *et al.*, 2008.

Tabela 3 – Escala de incapacidade neurológica

Partes do corpo observadas	Classificação	Características
<i>Cauda</i>	0	Um camundongo normal mantém sua cauda ereta enquanto se move.
	1	Se a extremidade da cauda está flácida, com tendência a cair.
	2	Se a cauda está completamente flácida e se arrasta na superfície.
<i>Membros inferiores</i>	0	Um camundongo normalmente tem uma marcha enérgica e não arrasta suas patas.
	1	Um dos dois testes seguintes é positivo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste da virada: enquanto mantém a cauda entre o polegar e o indicador, vire o animal de barriga para cima e observe o tempo que ele leva para acertar a postura. Um camundongo saudável se vira imediatamente. Uma demora sugere fraqueza nas patas traseiras.</li> <li>• Posicionar o camundongo na parte externa da gaiola e observar sua movimentação à medida que ele atravessa de uma extremidade à outra da gaiola. Se uma ou ambas as patas traseiras frequentemente atravessaram as barras da gaiola, consideramos que há uma paralisia parcial.</li> </ul>
	2	Ambos os testes posteriores são positivos.
	3	Uma ou ambas as patas traseiras mostram sinais de paralisia, mas algum movimento é preservado, por exemplo: o animal pode agarrar e se manter na parte interna da gaiola por um curto momento antes de soltar.
	4	Quando ambas as patas traseiras estão paralisadas e o camundongo as arrasta enquanto se move.
<i>Patas dianteiras</i>	0	Um camundongo normal usa suas patas dianteiras para se agarrar e andar e mantém sua cabeça ereta.
	1	Andar é possível, mas difícil devido à fraqueza em uma ou ambas as patas. Por exemplo, as patas dianteiras são consideradas fracas quando o camundongo tem dificuldade em se agarrar na parte interior da gaiola. Outro sinal de fraqueza é a falta de tônus no pescoço.
	2	Quando uma parte dianteira está paralisada

		(impossibilidade de agarrar) e o camundongo fica dando voltas em torno da pata paralisada. Nesse momento, o pescoço já perdeu muito de seu tônus muscular.
	3	O camundongo não pode se mover e não consegue beber água ou se alimentar.
<i>Bexiga</i>	0	Um camundongo normalmente tem total controle sobre a bexiga.
	1	Um camundongo é considerado incontinente quando a porção posterior de seu corpo está encharcada de urina.

Fonte: De Paula *et al.* (2008). \*Pontuação escolhida aleatoriamente.

#### 4.4.3 Obtenção de plasma, órgãos e células

Após 21 dias de indução da EAE, os camundongos foram eutanasiados por dose letal de xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (100 mg/Kg), sendo coletados o sangue (punção cardíaca), para obtenção de leucócitos, baço, linfonodo inguinal, medula espinhal e o cérebro, para dosagem de citocinas, avaliação do perfil celular e histopatológico.

#### 4.5 Análise histopatológica

No 21º dia da indução de EAE, os animais foram eutanasiados e perfundidos com formalina tamponada. Após, o cérebro e a medula espinhal foram excisados e fixados em formalina tamponada (PBS 10%). Cortes transversais de cérebro e da medula, em nível cervical, torácico e lombar, foram processados para perfusão de parafina. Cortes de 5 µm foram corados em H&E (Hematoxilina e Eosina) para avaliar a presença de infiltrados inflamatórios e cortes de 8 µm foram corados com luxol *fast blue* para a avaliação da desmielinização. Os cortes foram examinados e documentados em microscópio Leica DM 1000 através de uma câmera Leica MC 120 HD e software LAS 4.6.1 para a obtenção das imagens.

#### 4.6 Dosagem de citocinas por ELISA

Na avaliação dos níveis de citocinas, porções dos órgãos foram congelados (cérebro e medula espinhal) a -80<sup>0</sup> C, sendo descongelados apenas no dia do processamento. Posteriormente ao descongelamento, os órgãos foram macerados em tampão de extração de

citocinas (100 mg/mL) composto de: 0,4 M de NaCl, 0,05% de tween 20, 0,5% de soroalbumina bovina-BSA, 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil-PMSF, 0,1 M de cloreto de benzetônico-BC, 10 mM de ácido etileno diamino tetracético-EDTA e 20 pM de aprotinina-AP. Em seguida, o material foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -70 °C. As concentrações de citocinas nos sobrenadantes foram determinadas com o método ELISA, utilizando anticorpos e concentrações comercialmente disponíveis de acordo com os procedimentos recomendados pelos fabricantes para as citocinas procuradas.

Os sobrenadantes dos órgãos coletados foram submetidos à dosagem das citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL10, IL-12p70, TNF, IFN- $\gamma$ ). Placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico conforme instruções do fabricante (BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA). Estas foram incubadas *overnight* e, em seguida, lavadas com PBS-Tween por 04 vezes, bloqueadas com PBS-soro fetal por 01 hora. Após o bloqueio de 01 hora, as placas foram novamente lavadas e adicionados nos poços das placas às amostras e aos padrões de citocinas. As placas foram incubadas por 2 horas a 4 °C. Após o período de incubação, elas foram lavadas e o segundo anticorpo foi adicionado. As placas foram incubadas por 01 hora a temperatura ambiente e lavadas por mais 04 vezes. Foi acrescentado o conjugado enzimático e as placas foram incubadas por mais 01 hora. Transcorrido a incubação, a reação foi revelada pela adição do substrato e por fim bloqueada com ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas Ezread biochrom a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas padrão obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes para IL-1 $\beta$ , IL-6, IL10, IL-12p70, TNF, IFN- $\gamma$  (BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA).

#### **4.7 Avaliação dos leucócitos através da citometria de fluxo**

Células isoladas dos linfonodos inguinais, baço, cérebro e medula espinhal foram contadas e incubadas com anticorpos anticamundongo CD80-PerCP-Cy5.5, anticamundongo MHC classe II-BB515, anticamundongo CD86-BV421, anticamundongo CD11c-PE-Cy7, ou anticamundongo CD4-PerCP-Cy5.5, anticamundongo CD8-APC, anticamundongo CD25-BV510 (BD *Biosciences Pharmingen, San Diego, USA*). Após 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas com tampão de marcação PBS, 1% SFB e 0.09% de azida sódica e tampão de fixação contendo paraformaldeído (BD *Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA*) e lavadas em tampão de permeabilização (BD *Biosciences, Pharmigen, San*

Diego, USA). Após as marcações extracelulares as células CD4<sup>+</sup> foram submetidas às marcações intracelulares com anticorpos, anticamundongo IFN- $\gamma$ -BV421, anticamundongo IL-10-PE, anticamundongo IL-17-PE-Cy7, anticamundongo Foxp3-Alexa Fluor 488, (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). A captura das células foi feita utilizando-se o citômetro de fluxo FACS Verse® (Becton Dickinson, EUA) e as análises realizadas com FCS Express version 3.

#### **4.8 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism® versão 5.0. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov para a distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para determinar as diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

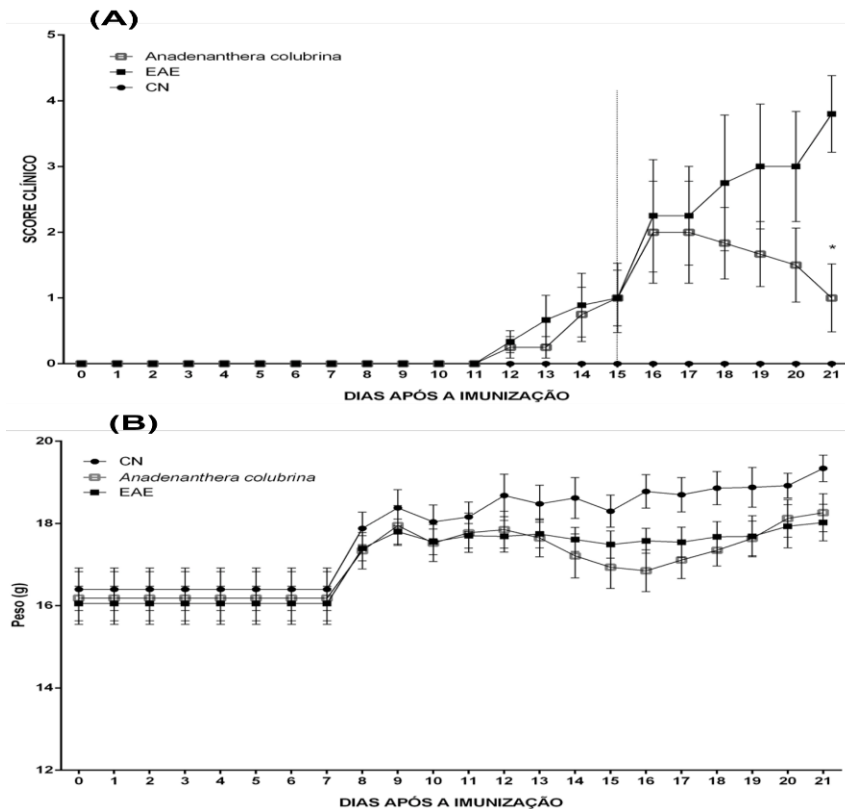
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do curso clínico da doença

Para avaliação da incapacidade neurológica e evolução do quadro clínico dos grupos de camundongos EAE (induzidos/não tratados), grupo *A. colubrina* (induzido e tratado) e grupo controle, foi feita a atribuição de pontos aos sinais clínicos da tabela 2, além do monitoramento da variação no peso dos camundongos. Os resultados obtidos do escore clínico demonstraram que no grupo EAE houve a detecção do escore clínico no 12<sup>o</sup> dia após a indução da EAE, o qual foi progredindo até atingir o pico no 21<sup>o</sup> dia após a indução, um escore clínico já esperado (Figura 10). Já no grupo tratado com extrato de *A. colubrina*, o pico ocorreu no 16<sup>o</sup> dia após a indução do modelo onde se observa uma diminuição dos sinais clínicos da EAE, com uma significância expressiva com relação ao grupo EAE (induzido e não tratado) no 21<sup>o</sup> dia após a indução ( $p < 0,05$ ) (Figura 10A).

Conforme demonstrado abaixo, não houve diferença significativa na avaliação do peso dos animais dos diferentes grupos (EAE, *A. colubrina* e controle negativo) (Figura 10B).

**Figura 10 – Avaliação dos sinais clínicos da EAE**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Os animais foram monitorados diariamente para os sinais clínicos da EAE após imunização com 100 µg de peptídeo MOG35-55. Os camundongos foram tratados (n = 8) ou não (n = 8), com 200 mg/kg de extrato etanólico de *A. colubrina* durante 6 dias. (A) Escore clínico dos camundongos tratados, e não-tratados, com *Anadenanthera colubrina*. (B) Medidas de peso dos camundongos induzidos tratados e não-tratados. A linha pontilhada indica o início do tratamento. Cada ponto representa a média aritmética ± SEM. \* indica  $p < 0,05$  quando comparados os animais tratados (*A. colubrina*) aos animais não tratados (EAE).

## 5.2 Avaliação dos níveis de citocinas na medula e cérebro

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF e anti-inflamatória IL-10 dosadas no sobrenadante do macerado cerebral dos animais apresentaram níveis mais elevados ( $p < 0,05$ ) no grupo controle EAE (induzidos/não tratados), comparado ao grupo controle negativo (não induzidos/não tratados) conforme esperado para o modelo experimental proposto. Apenas a citocina pró-inflamatória IL-12p70 apresentou-se em menor nível após indução do modelo. Esses dados sugerem que o desenvolvimento do processo inflamatório ocorreu da forma esperada no modelo experimental escolhido, validando o seu uso nesse estudo (Tabela 4).

Quando comparamos os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-

12p70, IFN- $\gamma$  e TNF dosadas no sobrenadante do macerado cerebral dos animais EAE (induzidos/não tratados) com os animais *A. colubrina* (induzidos/tratados com extrato *A. colubrina*), observou-se uma redução significativa para IL-12p70 e TNF ( $p < 0,05$ ) em animais tratados com o extrato de *A. colubrina* (Tabela 4). Em contrapartida, o tratamento com *A. colubrina* não foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  quando comparados ao grupo EAE. Um aumento significativo no nível de citocina anti-inflamatória IL-10 foi verificado para o grupo tratado com o extrato, comparado ao grupo EAE ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4 – Avaliação das citocinas no cérebro**

Citocinas	Grupos média <sup>a</sup> ( $\pm$ erro padrão)			Valor p*
	Controle negativo	EAE	<i>A. colubrina</i>	
IL-1 $\beta$	1410(60,55)	1691(27,05)	2238(67,89)	0,02
IL-6	667,3(9,10)	691,5(7,05)	868(55,16)	0,016
IL-12p70	2397(39,84)	1543(194,2)	698,1(45,95)	0,005
IFN- $\gamma$	62,45(6,84)	91,75(6,75)	192,40(11,68)	0,028
TNF	484,0(43,46)	636,8(17,55)	435,5(45,87)	0,003
IL-10	3788(158,5)	4143(194,8)	5554(319,4)	0,004

Fonte: Elaborado pela autora (2023). a: pg/ml; \*quando comparado grupo *A. colubrina* com grupo EAE. Níveis de citocinas (pg/ml) no sobrenadante do macerado do cérebro de camundongos imunizados com 100  $\mu$ g de peptídeo MOG35-55 e tratados (n = 8) ou não-tratados (n = 8), com 200 mg/kg de extrato etanólico de *A. colubrina* no 21º dia pós-imunização. Cada coluna representa a média aritmética. SEM.

Enquanto isso, no macerado da medula espinhal, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de todas as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$  e TNF dosadas no grupo EAE (induzidos/não tratados), em comparação ao grupo controle, em que a condição estudada não foi induzida. Para a citocina anti-inflamatória IL-10, houve uma redução em seus níveis quando comparados os animais do grupo controle negativo ao grupo EAE ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5).

O tratamento com o extrato de *A. colubrina* reduziu significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias dosadas ( $p < 0,05$ ), exceto IL-6 e IL-12p70 (Tabela 5). Contudo, o grupo tratado com *A. colubrina* também apresentou redução para IL-10, de perfil anti-inflamatório, indicando um efeito inibitório da resposta imune induzida no modelo EAE após tratamento com o EtAc (Tabela 5).



**Tabela 5 – Avaliação das citocinas na medula espinhal**

Citocinas	Grupos média <sup>a</sup> (±erro padrão)			Valor p*
	Controle negativo	EAE	<i>A. colubrina</i>	
IL-1 $\beta$	1290(46,95)	1685(69,05)	1021(36,78)	0,008
IL-6	822,5(35,57)	1354(160,5)	805,4(149,5)	0,056
IL-12p70	3557(212,9)	4403(497,7)	2766(775,4)	0,191
IFN- $\gamma$	158,5(10,70)	232,5(25,41)	101,1(3,59)	0,007
TNF	1960(20,57)	2076(67,64)	1417(83,48)	0,008
IL-10	748,6(74,69)	300,6(7,21)	118,8(24,60)	0,007

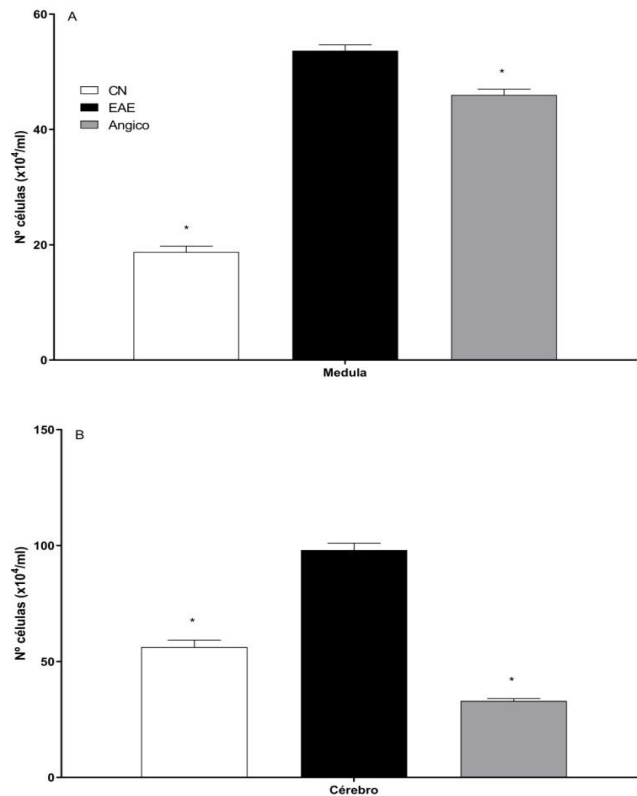
Fonte: Elaborado pela autora (2023). a: pg/ml; \*quando comparado grupo *A. colubrina* com grupo EAE. Níveis de citocinas (pg/ml) no sobrenadante do macerado da medula de camundongos imunizados com 100  $\mu$ g de peptídeo MOG35-55 e tratados (n = 8) ou não-tratados (n = 8), com 200 mg/kg de extrato etanólico de *A. colubrina* no 21º dia pós-imunização. Cada coluna representa a média aritmética. SEM.

### 5.3 Contagem de células

#### 5.3.1 Número de células leucocitárias no sistema nervoso central

Foi realizada a análise do número de células leucocitárias no cérebro e medula espinhal no 21º dia pós-indução. De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com o extrato de *A. colubrina* apresentou uma redução no número absoluto de células na medula espinhal (Figura 11A), e no cérebro (Figura 11B) quando comparados com o grupo EAE ( $p < 0,05$ ).

**Figura 11 – Número de células isoladas da medula espinhal (A) e cérebro (B) no 21<sup>o</sup> dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>**

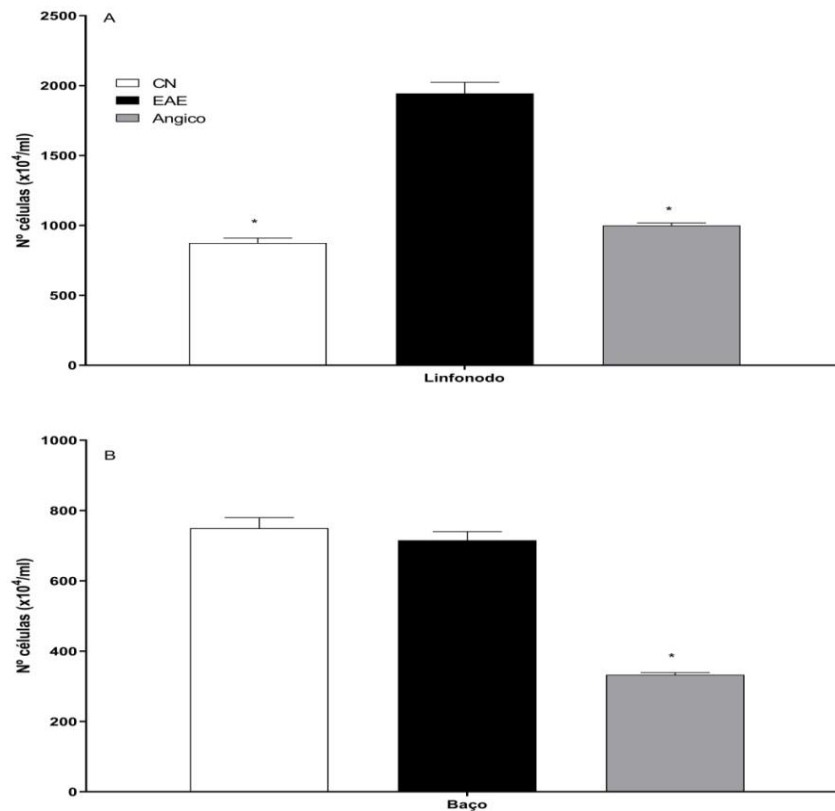


Fonte: Elaborado pela autora (2023). Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15<sup>o</sup> dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao grupo EAE.

### 5.3.2 Número de células leucocitárias em órgãos linfoides secundários

Foi realizada a análise do número de células no linfonodo e baço no 21<sup>o</sup> dia pós-indução. De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com o extrato de *A. colubrina* apresentou uma redução no número absoluto de células no linfonodo (Figura 12A) e no baço (Figura 12B), quando comparados com o grupo EAE (p<0,05).

**Figura 12 – Número de células isoladas do linfonodo (A) e baço (B) no 21<sup>o</sup> dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15<sup>o</sup> dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

#### 5.4 Avaliação dos leucócitos através da citometria de fluxo

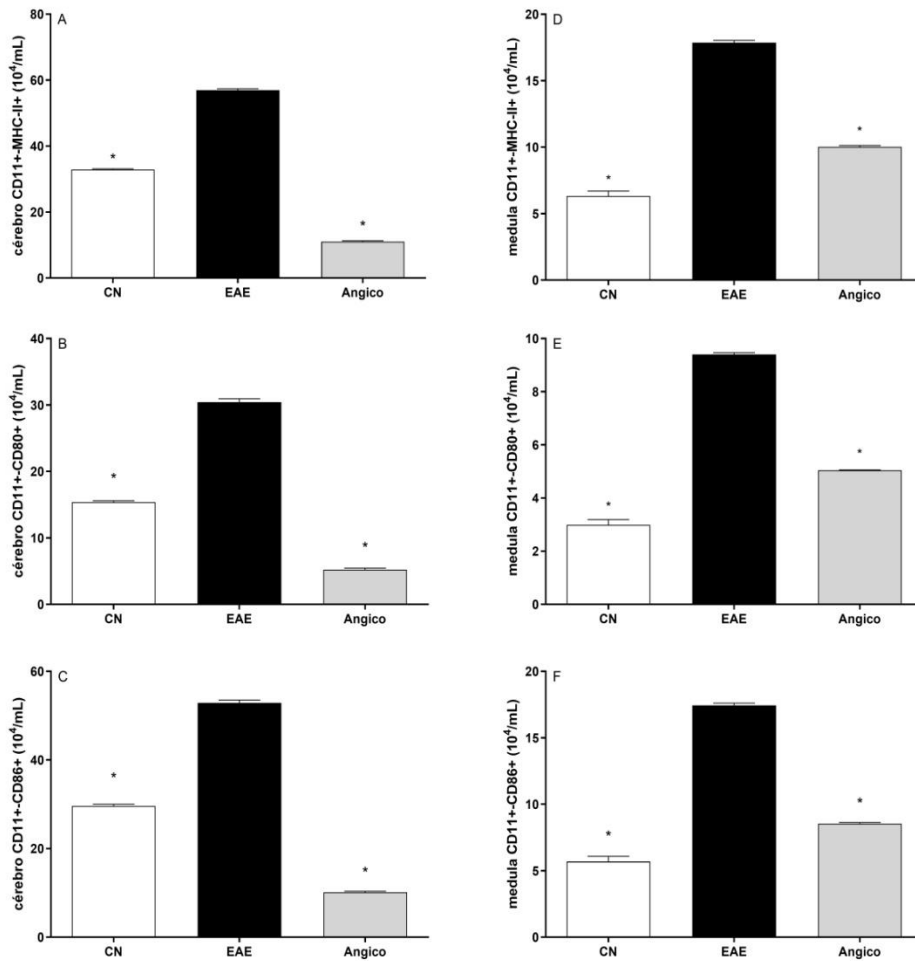
Para a avaliação das possíveis alterações na expressão de marcadores celulares, o cérebro, a medula espinhal, os linfonodos inguinais e o baço foram submetidos à marcação e análise por citometria de fluxo.

##### 5.4.1 Expressão de marcadores celulares no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro)

Foi realizada a análise do número absoluto das células do cérebro e medula espinhal no 21<sup>o</sup> dia pós indução.

No cérebro (Figura 13 A, B, C) e medula espinal (Figura 13 D, E, F) o número de células CD11<sup>+</sup> MHC II, CD11<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> do grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina* apresentou uma redução significativa, quando comparado com o grupo EAE ( $p < 0,05$ ).

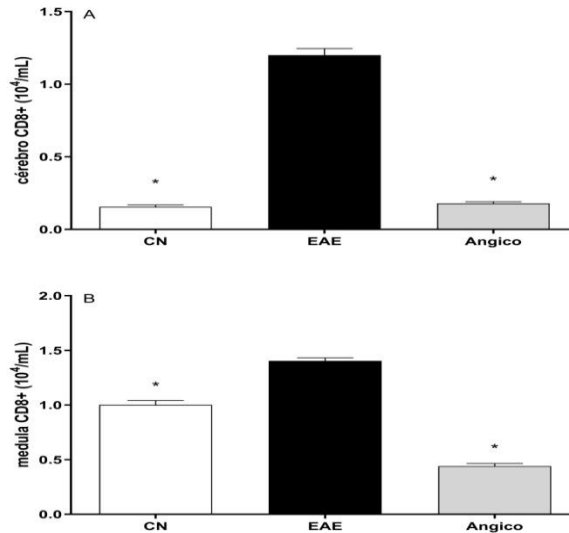
**Figura 13 - Números de células CD11<sup>+</sup>c no sistema nervoso central (medula espinal e cérebro)**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células CD11<sup>+</sup>+MHC-II<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>+CD80<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>+CD86<sup>+</sup>, determinada por citometria de fluxo de células isoladas do cérebro (A, B, C) e medula (D, E, F) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica  $p < 0,05$  quando comparado ao EAE.

Em células T CD8<sup>+</sup> do grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina* observa-se uma redução, no cérebro (Figura 14A) e na medula espinal (Figura 14B) quando comparado com o grupo EAE ( $p < 0,05$ ).

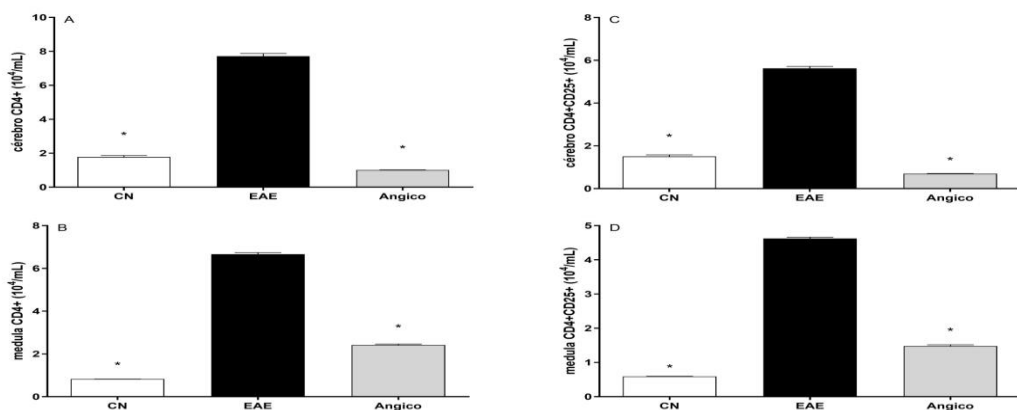
**Figura 14 - Números de células T CD8<sup>+</sup> no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro)**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células T CD8<sup>+</sup> determinada por citometria de fluxo em células isoladas do cérebro (A) e medula (B) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, Angico= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

Em células T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, do grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina* observa-se uma redução no número de células T, no cérebro (Figura 15 A, C) e na medula espinhal (Figura 15 B, D) quando comparado com o grupo EAE (p<0,05).

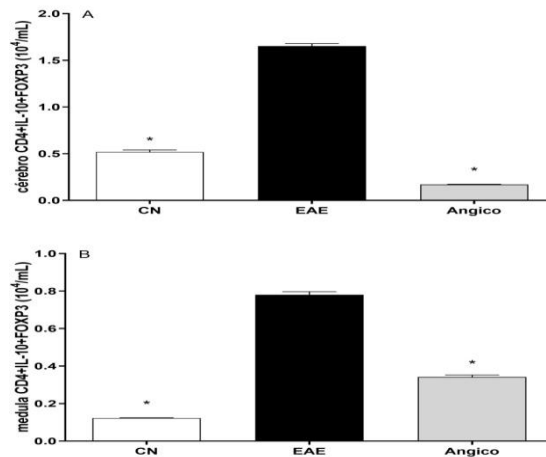
**Figura 15 - Números de células CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro)**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinada por citometria de fluxo em células isoladas do cérebro (A, C) e medula (B, D) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

Na Medula espinhal (Figura 16B) e cérebro (Figura 16A), o número de células  $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+ \text{IL-10}$  do grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina* não apresentou um aumento considerável, quando comparado com o grupo EAE ( $p < 0,05$ ).

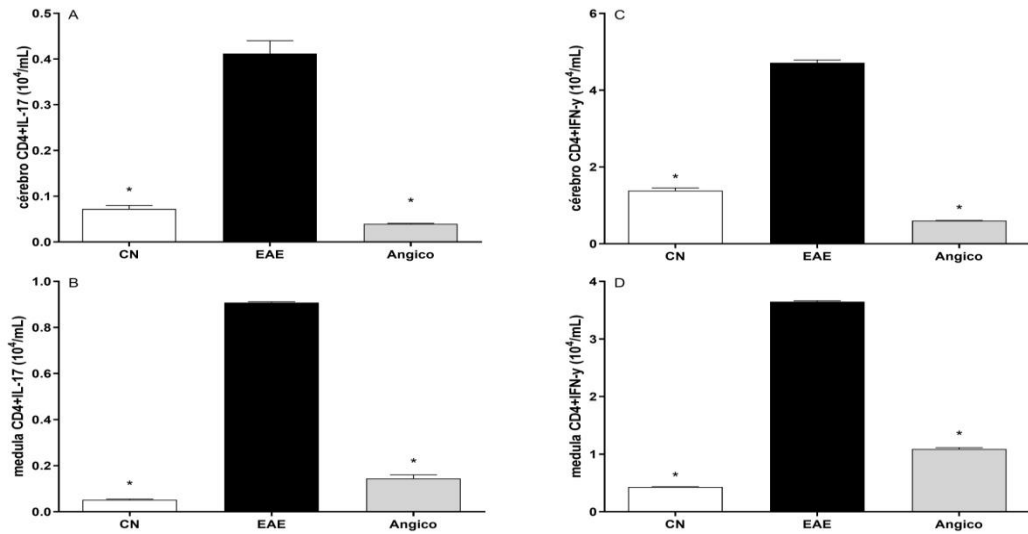
**Figura 16 – Números de células T  $\text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+ \text{IL-10}$  no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro)**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células T  $\text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+ \text{IL-10}$  determinada por citometria de fluxo em células isoladas do cérebro (A) e medula (B) no 21º dia após a imunização com peptídeo  $\text{MOG}_{35-55}$ . Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização ( $n=8$  animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica  $p < 0,05$  quando comparado ao EAE.

Na medula espinhal (Figura 17 B, D) e cérebro (Figura 17 A, C) o número de células  $\text{CD4}^+ \text{IL-17}$ ,  $\text{CD4}^+ \text{IFN-}\gamma$  do grupo tratado com o extrato de *A. colubrina* apresentaram redução significativa, quando comparado com o grupo EAE ( $p < 0,05$ ).

**Figura 17 - Números de células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL-17, CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro)**



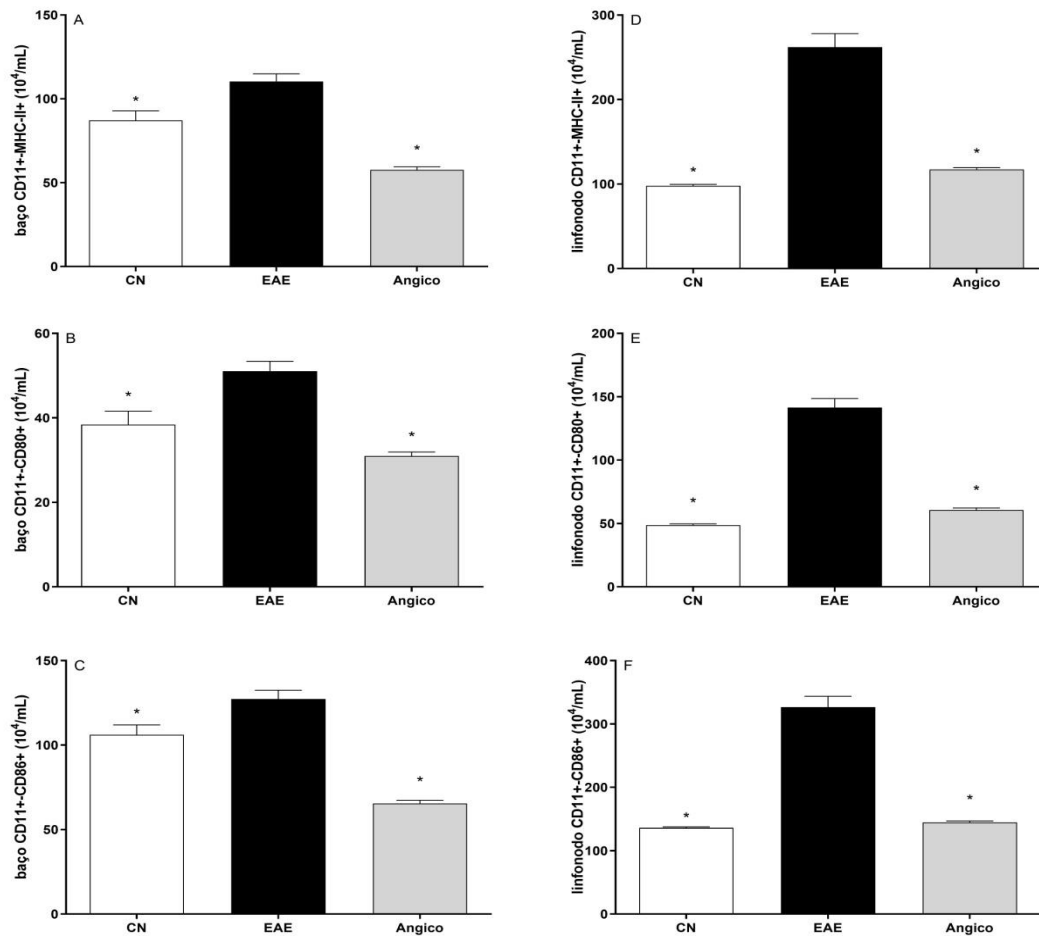
Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL-17, CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  determinada por citometria de fluxo em células isoladas do cérebro (A, C) e medula (B, D) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

#### 5.4.2 Expressão de marcadores celulares em órgãos linfóides secundários

Foi realizada a quantificação do número absoluto das células do baço e linfonodos inguinais, no 21º dia pós-indução, que expressavam os marcadores analisados.

No baço (Figura 18 A, B, C) e no linfonodo (Figura 18 D, E, F) o número de células CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> apresentou uma redução no grupo tratado com o extrato de *A. colubrina*, quando comparado com o grupo EAE (p<0,05).

**Figura 18 - Números de células CD11<sup>c</sup> em órgãos linfóides secundários (baço e linfonodos inguinais)**

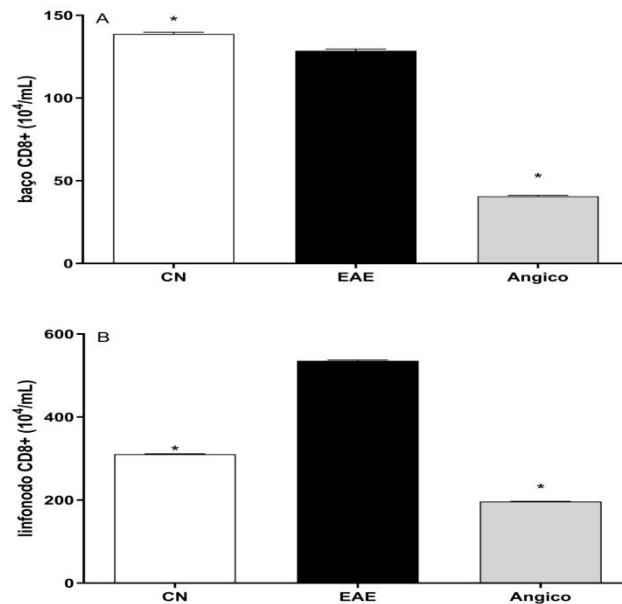


Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células CD11<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>, determinada por citometria de fluxo de células isoladas do baço (A, B, C) e linfonodo (D, E, F) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

Em células T CD8<sup>+</sup> do grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina* observa-se uma redução no número dessas células, no baço (Figura 19A) e no linfonodo (Figura 19B) quando comparado com o grupo EAE (p<0,05).



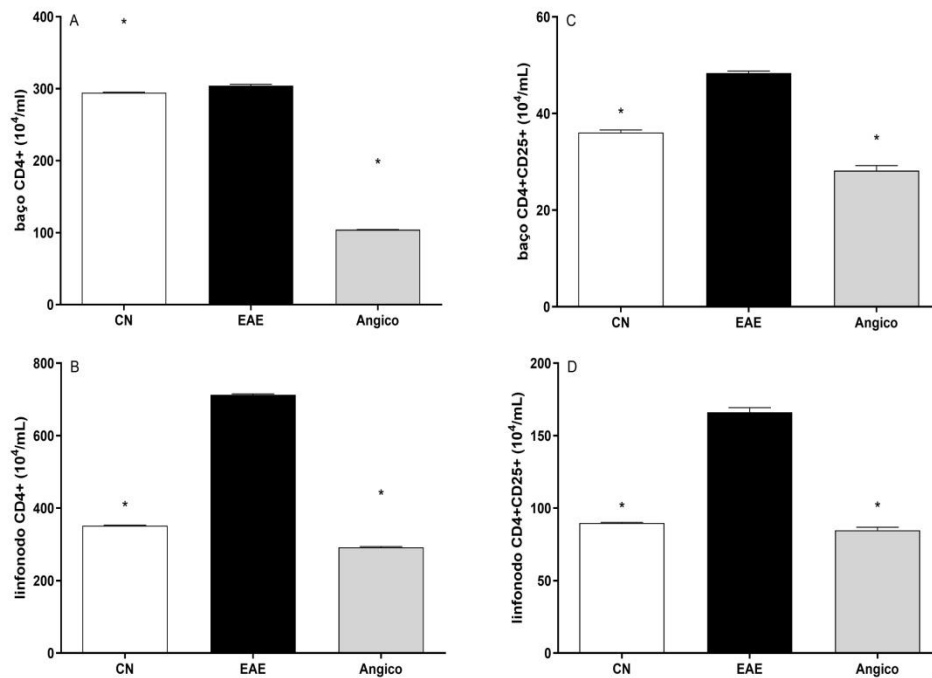
**Figura 19 –Números de células T CD8<sup>+</sup> em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais)**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células CD8<sup>+</sup> determinada por citometria de fluxo em células isoladas do baço (A) e linfonodo (B) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

Em células T CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, observa-se uma redução no número dessas células, no baço (Figura 20 A, C) e no linfonodo (Figura 20 B, D), no grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina* quando comparado com o grupo EAE (p<0,05).

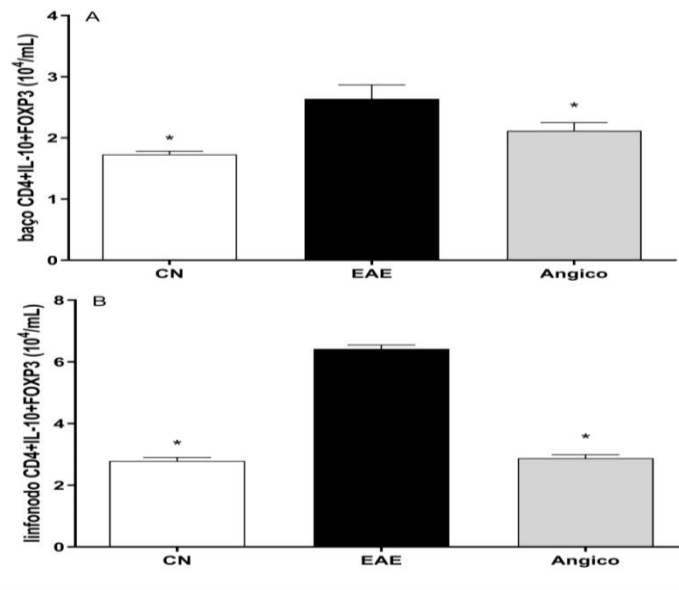
**Figura 20 - Números de células T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25 em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais)**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25 determinada por citometria de fluxo em células isoladas do baço (A, C) e linfonodo (B, D) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

No presente resultado observou-se que o tratamento com o extrato etanólico de *A. colubrina* não foi capaz de aumentar os níveis das células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> (células T reguladoras) no baço (Figura 21A) e linfonodo (Figura 21B) em relação ao grupo EAE (p<0,05).

**Figura 21 - Números de células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL-10 em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais)**

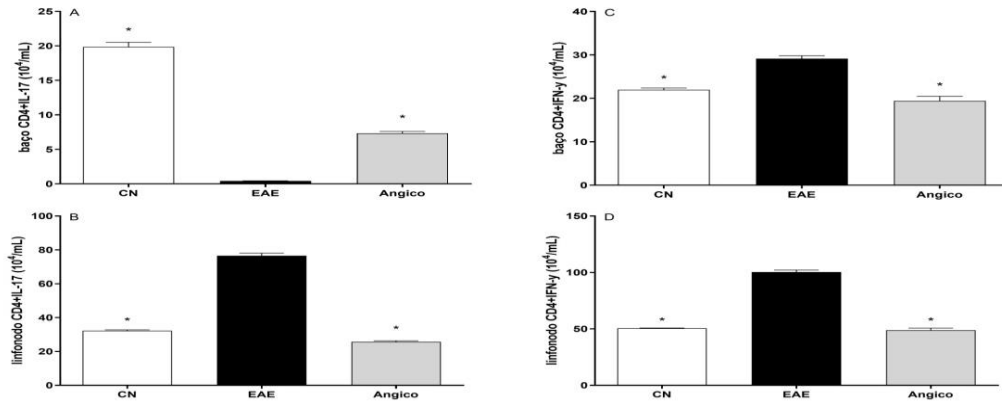


Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL-10 determinada por citometria de fluxo em células isoladas do baço (A) e linfonodo (B) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15º dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, Angico= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

No linfonodo (Figura 22B), observou-se uma redução do número de células T CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> do grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina*, quando comparado com o grupo EAE. Em contrapartida foi observado um baixo número de células T CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> no baço (Figura 22A) do grupo EAE quando comparado ao grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina* (p<0,05).

O número de células T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no baço (Figura 22C) e no linfonodo (Figura 22D) apresentou-se reduzido no grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina*, quando comparado com o grupo EAE (p<0,05).

**Figura 22 - Números de células T CD4<sup>+</sup> IL-17, CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  em órgãos linfóide secundários (baço e linfonodos inguinais)**



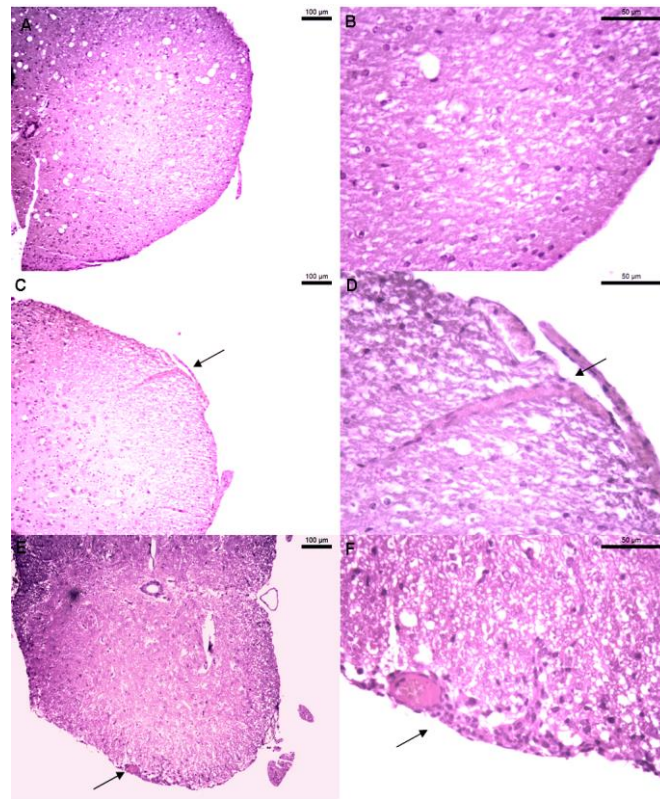
Fonte: Elaborado pela autora (2023). Células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL-17 CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  determinada por citometria de fluxo em células isoladas do baço (A, C) e linfonodo (B, D) no 21<sup>o</sup> dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina* que foi iniciado no 15<sup>o</sup> dia após a imunização (n=8 animais por grupo). CN= grupo não induzido/não tratado, EAE= grupo induzido/ não tratado, *A. colubrina*= grupo induzido/ tratado com extrato etanólico de *A. colubrina*. \* indica p<0,05 quando comparado ao EAE.

## 5.5 Avaliação histopatológica

### 5.5.1 Avaliação do efeito do extrato etanólico de *A. colubrina* no infiltrado inflamatório da medula espinhal dos animais com EAE

No 21<sup>o</sup> dia após a imunização foi realizado cortes transversais na medula espinhal para a avaliação do infiltrado inflamatório (Figura 23). Pode-se observar um aumento do infiltrado inflamatório nos tecidos dos animais com EAE (Figuras 23C e 23D) quando comparados com o grupo controle negativo (Figuras 23A e 23B) e uma relativa redução do infiltrado após o tratamento (Figuras 23E e 23F).

**Figura 23 – Histopatologia da medula espinhal dos camundongos**



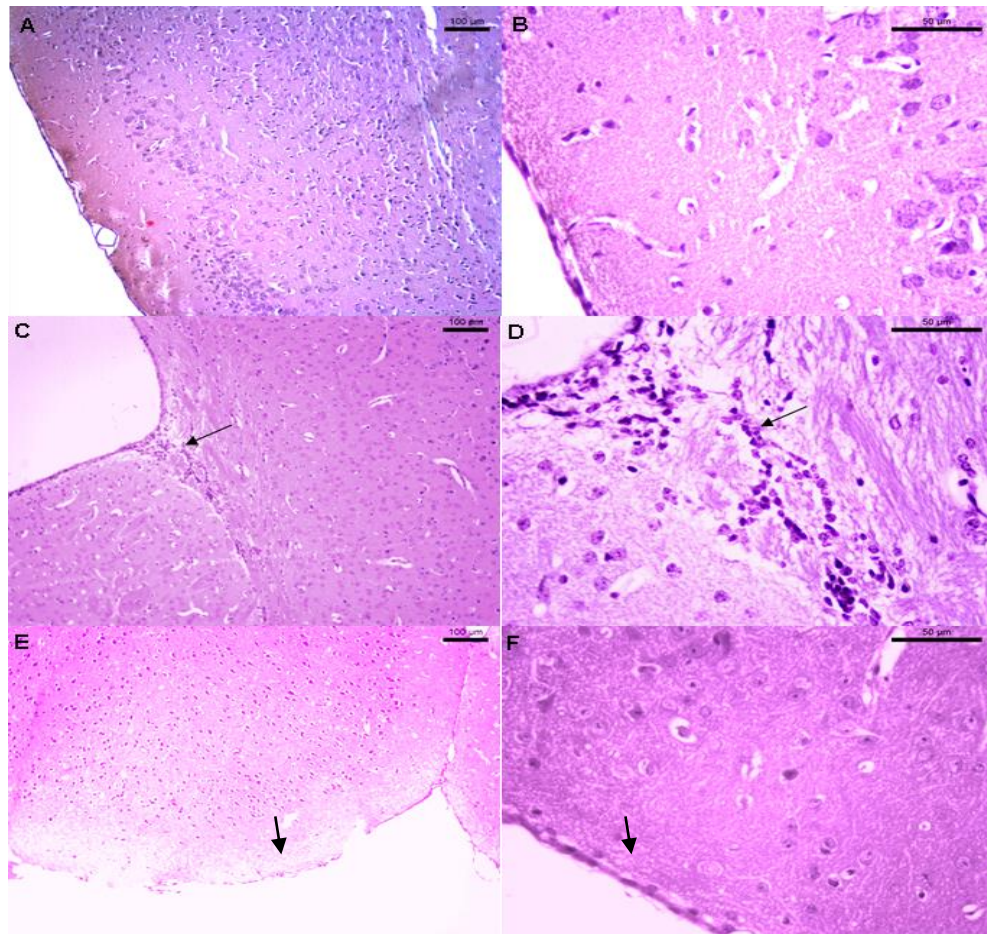
Fonte: Elaborado pela autora (2023). Histopatologia da medula espinhal dos camundongos imunizados ou não com 100  $\mu\text{g}$  de peptídeo MOG35-55 (n=8 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A, B), EAE= grupo imunizado/não tratado (C, D), Angico= grupo imunizado e tratado com 200 mg/kg Extrato etanólico de *A. colubrina* durante 6 dias (E, F). Cortes representativos dos grupos examinados, corados com hematoxilina e eosina (H&E), para análise do infiltrado de células. Aumento original: objetiva de 10x (Figura A, C, E), 40x (B, D, F). Escala das barras= 100 $\mu\text{m}$  (10x) e 50  $\mu\text{m}$  (40x). Setas indicam os infiltrados celulares.

### 5.5.2 Avaliação do efeito do extrato etanólico de *A. colubrina* no infiltrado inflamatório do cérebro dos animais com EAE

No 21<sup>o</sup> dia após a imunização foi realizado cortes transversais no cérebro para a avaliação do infiltrado inflamatório (Figura 24), os quais foram corados com H&E para os grupos controle negativo, EAE e Angico.

Os cortes histológicos do cérebro dos animais do Grupo CN foram considerados normais, sem a presença de infiltrados (Figuras 24A e 24B). Os animais do grupo EAE apresentaram infiltrados quando comparados ao grupo CN (Figuras 24C e 24D). O tratamento com o extrato etanólico da *A. colubrina* (Angico) reduziu o infiltrado de células inflamatórias, quando comparado com o grupo EAE (Figuras 24C, 24D, 24E e 24F).

**Figura 24 – Histopatologia do cérebro dos camundongos**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Histopatologia do cérebro dos camundongos imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 (n=8 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A, B), EAE= grupo imunizado / não tratado (C, D), Angico= grupo imunizado e tratado com 200 mg/kg Extrato etanólico de *A. colubrina* durante 6 dias (E, F). Cortes representativos dos grupos examinados, corados com hematoxilina e eosina (H&E), para análise do infiltrado de células. Aumento original: objetiva de 10x (Figura A, C, E), 40x (B, D, F). Escala das barras= 100µm (10x) e 50 µm (40x). Setas indicam os infiltrados celulares.

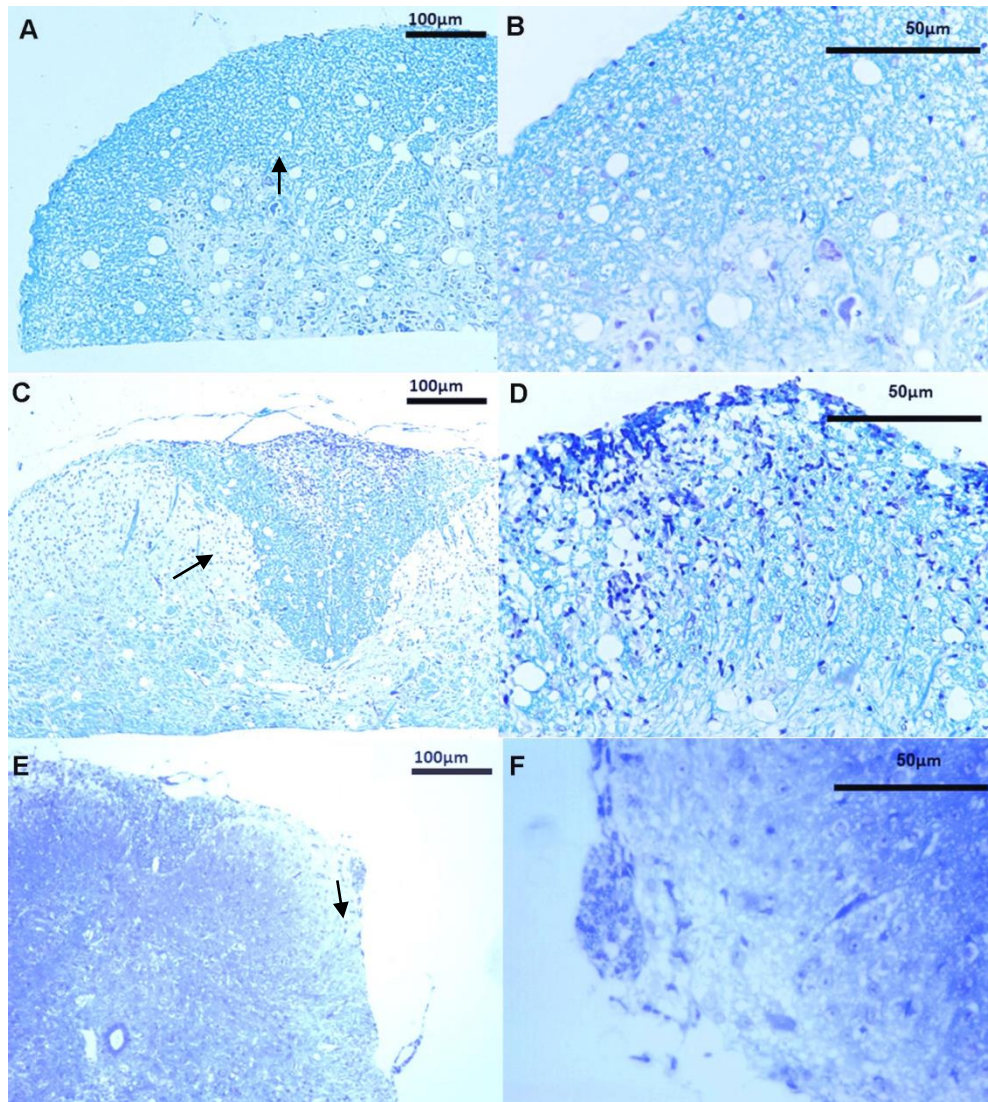
### 5.5.3 Avaliação do efeito do extrato etanólico de *A. colubrina* na desmielinização na medula espinhal dos animais com EAE

No 21º dia pós-imunização foi realizada a avaliação da desmielinização da medula espinhal. Os cortes transversais da medula espinhal foram corados com *luxol fast blue* para avaliação da presença de desmielinização.

Os animais do CN, não imunizado, não apresentaram focos de desmielinização na medula espinhal (Figuras 25A e 25B).

Os animais do grupo EAE, apresentaram maior número e focos mais extensos de desmielinização na medula espinhal, quando comparado aos animais dos grupos tratados com o extrato etanólico de *A. colubrina*, no 21º dia após indução (Figuras 25C, 25D, 25E e 25F).

**Figura 25 – Análise da desmielinização na medula espinhal dos camundongos**



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Histopatologia da medula espinhal dos camundongos imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 (n=8 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A, B), EAE= grupo imunizado/não tratado (C, D), Angico= grupo imunizado e tratado com 200 mg/kg Extrato etanólico de *A. colubrina* durante 6 dias (E, F). Cortes representativos dos grupos examinados, corados com luxol fast blue, para análise da desmielinização na medula espinhal. Aumento original: objetiva de 10x (Figuras 25A, 25C e 25E), 40x (Figuras 25B, 25D e 25F). Escala das barras= 100µm (10x) e 50 µm (40x). Setas indicam os infiltrados celulares.

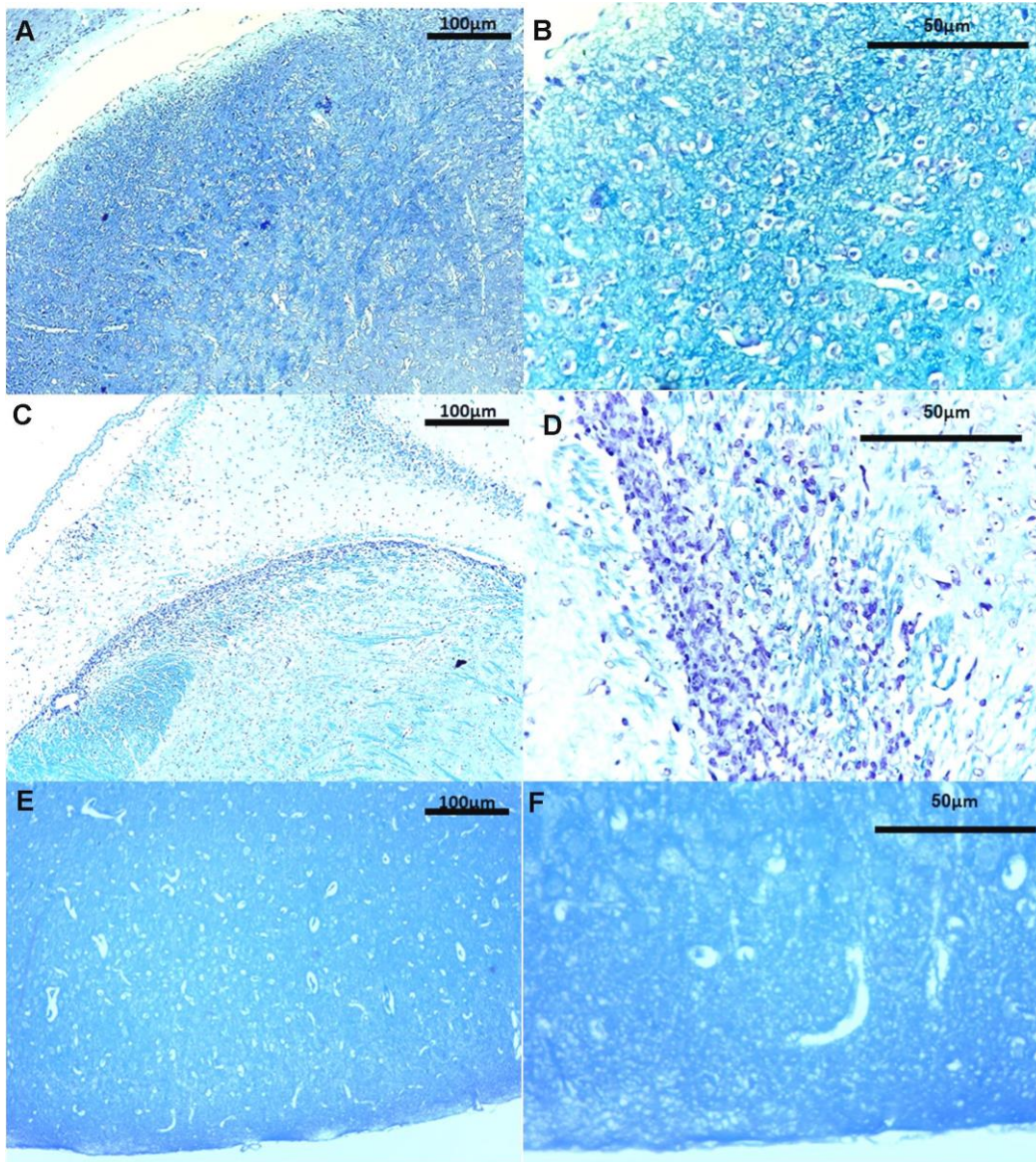
#### 5.5.4 Avaliação do efeito do extrato etanólico de *A. colubrina* na desmielinização do cérebro dos animais com EAE

No 21º dia pós-imunização foi realizada a avaliação da desmielinização do cérebro. Os cortes transversais do cérebro foram corados com *luxol fast blue* para avaliação da presença de desmielinização.

Os animais do CN, não imunizado, não apresentaram focos de desmielinização no cérebro (Figuras 26A e 26B).

Os animais do grupo EAE, apresentaram maior número e focos mais extensos de desmielinização no cérebro, quando comparado aos animais dos grupos tratados com o extrato etanólico de *A. colubrina*, no 21º dia após indução (Figuras 26C, 26D, 26E e 26F).

**Figura 26 – Análise da desmielinização no cérebro dos camundongos**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023). Histopatologia do cérebro dos camundongos imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 (n=8 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CN= grupo não imunizado (A, B), EAE= grupo imunizado/não tratado (C, D), Angico= grupo imunizado e tratado com 200 mg/kg Extrato etanólico de *A. colubrina* durante 6 dias (E, F). Cortes representativos dos grupos examinados, corados com luxol fast blue, para análise da desmielinização no cérebro. Aumento original: objetiva de 10x (Figuras 26A, 26C e 26E), 40x (Figuras 26B, 26D e 26F). Escala das barras= 100µm (10x) e 50 µm (40x).



## 6 DISCUSSÃO

No grupo Encefalomielite autoimune experimental (EAE) do presente trabalho os animais apresentaram sinais clínicos, infiltrados inflamatórios e desmielinização de acordo com a literatura (AHARONI *et al.*, 2021). No grupo tratado com o extrato etanólico de *A. colubrina* pode-se observar uma melhora no quadro clínico, redução dos infiltrados inflamatório e na desmielinização na medula espinhal e cérebro quando comparado ao grupo EAE.

Por estes motivos, este consiste em um modelo efetivo para avaliar o potencial terapêutico de novas drogas (SLOANE; LEDEBOER, 2009; OLECHOWSKI *et al.*, 2010). Atualmente, os tratamentos para a EM possuem várias desvantagens como, por exemplo, alto custo, efeitos colaterais que prejudicam a adesão terapêutica, além de não serem eficazes na contenção da doença (PLATTEN; STEINMAN, 2006).

A gênese dos sinais clínicos da EAE aparece quando células imunes entram no SNC, provocando uma produção e atividade de citocinas pró-inflamatórias no local causando a progressão da EAE. Nas lesões do SNC, células como Th1 e Th17 tem a capacidade de influenciar a concentração de células inflamatórias através da secreção de citocinas pró-inflamatórias que atuam contribuindo para o agravamento da doença (GLATIGNY; BETTELLI, 2018). Em contrapartida as citocinas anti-inflamatórias atuam na redução da resposta imunológica autoreativa (GLATIGNY; BETTELLI, 2018; JAHAN-ABAD *et al.*, 2019). Tornando-se relevante a dosagem de citocinas na EAE.

Inicialmente, foram dosadas as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 no sobrenadante do macerado de cérebro e medula. Os ensaios mostraram que o extrato de *A. colubrina* foi capaz de melhorar o escore clínico da EAE. Essa melhora pode estar correlacionada à redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$  e TNF no macerado da medula.

Como na EAE as células Th1 tem um papel patogênico através da produção de IFN- $\gamma$  no SNC, sendo uma citocina crucial da imuno-estimulação ou modulação das células Th1 (JAHAN-ABAD, 2019), a redução nos níveis de IFN- $\gamma$  no macerado medular após o tratamento com *A. colubrina* sugere que o extrato pode controlar o quadro inflamatório induzido no modelo EAE. Durante o processo inflamatório, a TNF é uma das primeiras citocinas a serem liberadas após o estímulo inflamatório e essa promove a liberação de outras citocinas como a IL-6 e a IL-1 $\beta$  (SFIKAKIS *et al.*, 2010). Por sua vez, essas citocinas são

importantes para o quadro inflamatório do modelo EAE, uma vez que foram encontradas em níveis altos no grupo EAE e baixos no grupo *A. colubrina*.

Apesar dos dados não demonstrarem redução nos níveis de todas as citocinas pró-inflamatórias dosadas em macerado cerebral após tratamento com *A. colubrina*, os resultados obtidos para as citocinas IL-12p70 e TNF sugerem um possível efeito inibitório do processo inflamatório induzido no modelo experimental. Em resultados obtidos, em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, foi observada a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de *A. colubrina in vivo* com a redução da IL-12 e redução de células inflamatórias e edemas em análises histológicas (JUNIOR *et al.*, 2021).

Estudos mostram que a IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória que leva a diminuição da liberação de diferentes citocinas, dentre elas a IL-12 e TNF. Desta forma, o aumento de IL-10 promove a regulação do processo inflamatório no SNC (KWILASZ *et al.*; 2015; SUN *et al.*, 2021). No presente estudo foi observado um aumento de IL-10 no sobrenadante de macerado cerebral, corroborando com estudo histológico onde foi encontrado uma diminuição de infiltrados em animais tratados com relação ao grupo EAE.

Podemos ressaltar que alguns tipos de flavonoides como a quercetina, hesperidina, apigenina quando testadas no modelo EAE, foram obtidos ótimos resultados desde a diminuição do escore dos camundongos tratados com relação aos não tratados. Apresentando também aumento em citocinas antiinflamatórias como a IL-10 e inibição de citocinas pró-inflamatórias como a IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-1 $\beta$  citocinas importantes no processo inflamatório da EM (GINWALA *et al.*, 2015; BAYAT *et al.*, 2021).

O processo inflamatório é coordenado por vários eventos, podendo ser provocado por uma sequência de diversos estímulos como: patógenos, agentes mecânicos e químicos nocivos e respostas autoimunes (DAMJANOV, 2005). A resposta inflamatória há o recrutamento de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios, estes evidenciados no processo inflamatório da EM (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo em células de órgãos linfáticos (linfonodo e baço) e no sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro), demonstram uma redução nas células fagocíticas quando houve o tratamento com o extrato etanólico de *A. colubrina*, sugerindo que a redução dessas células fagocíticas possa estar relacionada com a redução do processo inflamatório no grupo induzido/tratado (ADEREM, 2003).

As células imunes aparecem intermediando os processos críticos neurodegenerativos e inflamatórios do SNC dos indivíduos com EM. No SNC células como: macrófagos infiltrantes, micróglia, células B e células dendríticas, podem expressar

moléculas coestimuladoras e moléculas MHC de classe II que podem estar diretamente vinculadas à iniciação e desenvolvimento da EM e EAE (DONG; YONG, 2019). Moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e moléculas MHC de classe II expressas por micróglia estão presentes em lesões no SNC de EAE e EM (ZRZAVY *et al.*, 2017). O tratamento com *A. colubrina* levou a uma redução no número de células CD11<sup>+</sup>MHC II, CD11<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> no baço, linfonodo, cérebro e medula espinhal, condizendo com a melhora dos sinais clínicos e com os resultados do estudo histopatológico com o *luxol fast blue*, onde observa-se uma diminuição considerável das áreas de desmielinização dos camundongos no 21<sup>o</sup> dia do presente estudo. Assim as células CD80 e CD86 vem juntamente com as CD11<sup>+</sup> vem aumentando a capacidade de apresentação para montar uma resposta.

Durante a EAE as células dendríticas e os macrófagos infiltrados no SNC, são células apresentadoras de antígenos (APCs) com maior eficiência quando comparado com as micróglia, células residentes do SNC (WLODARCZYK *et al.*, 2014). No papel patogênico da EAE e EM encontramos as células T CD4<sup>+</sup>, células T helper (Th)1 secretoras de IFN- $\gamma$  e as células Th17 secretoras de IL-17, e as células T CD8<sup>+</sup> (GOVERMAN, 2009; BECHER; SEGAL, 2011). A produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL-17) são induzidas por células CD11<sup>+</sup> (GARBERS *et al.*, 2018). Assim o processo inflamatório da EAE e a EM é caracterizado pelo envolvimento de todas essas células ativadas e citocinas citadas anteriormente.

Pacientes com EM principalmente em suas recaídas, apresentam grande quantidade de moléculas citotóxicas como a perforina expressadas por células T CD8<sup>+</sup> (FRISULLO *et al.*, 2011). O tratamento com *A. colubrina* levou a uma redução do número de CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> no baço, linfonodo, medula e cérebro condizendo com os resultados observados no score clínico e histopatológico dos animais.

Os Linfócitos T CD4<sup>+</sup> possuem um subtipo de célula que possui um papel muito importante na regulação e supressão de células do sistema imunológico que são as chamadas de células T reguladoras (Treg). As Células Tregs controlam as respostas imunes a partículas próprias ou estranhas (antígenos) e ajudam na prevenção de doenças autoimunes (OHL *et al.*, 2014). As células Tregs são caracterizadas pela expressão do correceptor de células T CD4 e CD25. O desenvolvimento e a função dessas células (CD4, CD25), acontecem devido a expressão específica do fator de transcrição Forkhead box (FoxP3) (ADEEGBE *et al.*, 2006; OHL *et al.*, 2014). Em células T CD4<sup>+</sup> IL10 a expressão de FoxP3 não foi aumentada pelo extrato de *A. colubrina* em nenhum dos órgãos estudados (linfonodos, baço, cérebro e medula espinhal). Em contrapartida, foi observado um aumento da proteína, IL-10, no tecido do

cérebro dos animais tratados. Assim, o tratamento com EtAc apresenta formas distintas de atuação no SNC, porém com o mesmo resultado de redução significativa de infiltrados inflamatórios corroborando que houve uma redução do processo inflamatório nos tecidos analisados.

As células Th17 representam um elo essencial para os aspectos inflamatórios e neurodegenerativos encontrados na EM, através da secreção de citocinas como a IL-17 que possuem a capacidade de danificar a integridade da BHE e conseqüentemente estimular a migração de células (macrófagos, neutrófilos) para o SNC (CHENG; CHEN, 2014). A supressão de CD4<sup>+</sup> IL-17, encontrada no linfonodo, baço, cérebro e medula espinhal de animais EAE do presente estudo com extrato etanólico de *A. colubrina* tem um papel relevante, uma vez que CD4<sup>+</sup> IL-17 encontra-se presente nas formas progressivas da doença devido o seu efeito neurotóxico.

O IFN- $\gamma$  é essencial para respostas imunes mediadas por células Th1 e regula a expansão, ativação, homeostase e sobrevivência das células T (MILLER; MAHER; YOUNG, 2009). Durante a atividade da EM e EAE nas lesões, o IFN- $\gamma$  é encontrado em níveis aumentados, isso está associado a uma resposta inflamatória mediada por células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$  (LIBLAU; SINGER; MCDEVITT, 1995). O tratamento com EtAc reduziu os níveis de CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  de forma significativa na medula espinhal, cérebro, baço e linfonodo quando comparado com o grupo EAE, demonstrando assim uma inibição do processo inflamatório mediado por células Th1.

Com o intuito de agregar e complementar os resultados dos sinais clínicos, citocinas e células leucocitárias identificadas em órgãos linfóides (baço, linfonodo) e SNC (cérebro e medula espinhal), foi realizado neste estudo a avaliação histológica de cérebro e medula espinhal.

A análise histológica do cérebro e medula espinhal demonstrou infiltrados celulares inflamatórios nos animais induzidos e não tratados. Estudos anteriores, de histologia em animais com EAE, demonstraram a presença de infiltrados na medula e no cérebro dos animais (PIAO *et al.*, 2007; AHARONI *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos demonstraram uma redução de infiltrado de células inflamatórias do SNC em animais que receberam o tratamento com o extrato etanólico de *A. colubrina*, o que vem corroborar com a redução dos sinais clínicos dos animais tratados. Os resultados apresentados neste estudo vêm de encontro a hipótese de que a piora da EAE estão correlacionados com o influxo de células na medula espinhal e cérebro que potencializam o perfil Th1 e Th17.

Desta forma os resultados obtidos pelo tratamento com o extrato etanólico de *A. colubrina* sugerem um potencial terapêutico para a Encefalomielite autoimune experimental e conseqüentemente a esclerose múltipla.

## 7 CONCLUSÃO

- O tratamento com extrato etanólico de *A. colubrina*, reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$  e TNF no macerado da medula espinhal.
- O tratamento com o extrato etanólico de *A. colubrina*, é capaz de melhorar os sinais clínicos da EAE, com a redução de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 e IFN- $\gamma$ , CD8<sup>+</sup> e CD11<sup>c</sup> na medula espinhal, cérebro, baço e linfonodo dos animais.
- A análise histopatológica mostrou que o extrato etanólico de *A. colubrina* reduziu o infiltrado celular inflamatório e a desmielinização no SNC.

Estes resultados mostraram a efetividade do extrato etanólico de *A. colubrina* na melhora dos sinais clínicos da EAE, através da inibição do processo inflamatório, indicando possível potencial terapêutico para a Esclerose Múltipla. Entretanto, maiores estudos são necessários para avaliar os compostos isolados e os mecanismos de ação.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, P. *et al.* Esclerose Múltipla: epidemiologia, etiopatogenia, fisiopatologia e diagnóstico diferencial Multiple Sclerosis epidemiology, etiopathogenesis, physiopathology and differential diagnosis. **Sociedade Portuguesa de Neurologia**, v. 2, n. 1, p. 5-14, nov. 2012.
- ADEEGBE, D. *et al.* Cutting Edge: Allogeneic CD4+CD25+Foxp3+ T Regulatory Cells Suppress Autoimmunity while Establishing Transplantation Tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 12, p. 7149–7153, 2 jun. 2006.
- ADELMANN, M. *et al.* The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. **Journal of Neuroimmunology**, v. 63, n. 1, p. 17–27, dez. 1995.
- ADEREM, A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. s2, p. S340–S345, 15 jun. 2003.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, mar. 2007.
- AHARONI, R. *et al.* Titration of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) - induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. **Journal of Neuroscience Methods**, p. 108999, mar. 2021.
- AITKEN, M. *et al.* **Medicines Use and Spending in the U.S.:** A Review of 2015 and Outlook to 2020. Tampa: Institute for Healthcare Informatics, 2016.
- ALMEIDA, C.; SILVA, B. Estudo etnobotânico de plantas medicinais da mata ciliar do submédio São Francisco, Nordeste do Brasil. **Revista Ouricuri**, v. 10, n. 1, 2020.
- AL-OMAISHI, J.; BASHIR, R.; GENDELMAN, H. E. The cellular immunology of multiple sclerosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 4, p. 444-452, 1999.
- ALONSO, A.; HERNÁN, M. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. **Neurology**, v. 71, n. 129, p. 129, 2008.
- ANAGNOSTOULI, M. *et al.* Determinants of stigma in a cohort of hellenic patients suffering from multiple sclerosis: a cross-sectional study. **BMC Neurology**, v. 16, n. 1, 13 jul. 2016.
- BALASA, R. *et al.* The Matrix Metalloproteinases Panel in Multiple Sclerosis Patients Treated with Natalizumab: A Possible Answer to Natalizumab Non- Responders. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 17, n. 6, p. 464–472, 28 ago. 2018.
- BARBUGIANI, L. H. S. Os limites ao comércio de produtos farmacêuticos. **Revista de Direito Sanitário**, v. 15, p. 126, 2015.
- BAXTER, D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. **Occupational Medicine**, v. 57, n. 8, p. 552–556, 28 nov. 2007.

BAYAT, P. *et al.* Flavonoids, the compounds with anti-inflammatory and immunomodulatory properties, as promising tools in multiple sclerosis (MS) therapy: A systematic review of preclinical evidence. **International Immunopharmacology**, v. 95, 2021.

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

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

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

BIOGEN. **Brasil Produtos Farmacêuticos Ltda. AVONEX® betainterferona 1**, 2017.

BIOGEN. **Brasil Produtos Farmacêuticos Ltda. TYSABRI® natalizumabe**, 2018.

BITSCH, A. Acute axonal injury in multiple sclerosis: Correlation with demyelination and inflammation. **Brain**, v. 123, n. 6, p. 1174–1183, 1 jun. 2000.

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

BOOSS, J. *et al.* Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 62, n. 1-3, p. 219–232, dez. 1983.

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

BRANDÃO, I. V.; RAMOS, A. C. S.; SOUZA, I. C. L. **Leucopenia secundária ao uso de glicocorticoides**, 2016.

BRASIL. **Decreto 5.813 de 22 de Junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, 2006.

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

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

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

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



CARBAJAL, K. S.; MIRONOVA, Y. ET AL. The cell diversity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, v. 195, p. 2552–2559, 2015.

ÇELİKA, H.; KOSAR, M. Inhibitory effects of dietary flavonoids on purified hepatic NADH-cytochrome b5 reductase: structure–activity relationships. **Chem. Biol. Interact**, v. 197, n. 2–3, p. 130–109, 2012.

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

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

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

COSTELLO, K. *et al.* The Use of disease-modifying therapies in multiple sclerosis: Principles and Current Evidence. **A Consensus Paper by the Multiple Sclerosis Coalition**, 2019.

DAMJANOV, I. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7<sup>th</sup> edition. **Shock**, v. 23, n. 5, p. 482–483, mai. 2005.

DANIEL, R. C. A. *et al.* Comparative analysis of anti-Staphylococcus aureus action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 28, p. 2690–2696, 2014.

DE ALENCAR SANTOS JÚNIOR, J. G. *et al.* Esclerose Múltipla: Relato de caso e critérios de diagnóstico. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 1, 1 mar. 2016.

DE JONG, H. J. L. *et al.* Avaliando a segurança de interferons  $\beta$  em MS: Uma série de estudos de caso-controle aninhados. **Neurologia**, v. 88, n. 24, p. 2310–2320, 2017.

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

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

DELICES, M. *et al.* *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan: Ethnobotanical, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 300, p. 115745, jan. 2023.

DENDROU, Calliope A.; FUGGER, Lars; FRIESE, Manuel A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.

DONG, C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 584–588, abr. 2009.

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

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

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

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

ENGELHARDT, B.; KAPPOS, L. Natalizumab: Targeting  $\alpha$ 4-Integrins in Multiple Sclerosis. **Neurodegenerative Diseases**, v. 5, p. 16–22, 2008.

EPPS, H. L. V. Thomas Rivers and the EAE model. **The Journal of Experimental Medicine**, 2005. Disponível em: <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.2021ftav1>. Acesso em: 13 mai. 2021.

FRANKLIN, R. J. M.; FFRENCH-CONSTANT, C. Remyelination in the CNS: From biology to therapy. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 839–855, 2008.

FRISULLO, G. *et al.* Circulating CD8+CD56–perforin+ T cells are increased in multiple sclerosis patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 240-241, p. 137–141, dez. 2011.

FROHMAN, E. M.; RACKE, M. K.; RAINE, C. S. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis. **Journal of Medicine**, v. 354, n. 9, p. 942–955, 2006.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in Inflammation. **Current Drug Target - Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281–286, 1 jun. 2005.

GAJOFATTO, A.; BENEDETTI, M. D. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, p. 545, 2015.

GANDRA, A. Governo distribui medicação de alto custo para esclerose múltipla. **Agência Brasil**, 2019.

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

GENZYME A SANOFI COMPANY. AUBAGIO® teriflunomida. 2016.

GINWALA, R. et al. Apigenin, a Natural Flavonoid, Attenuates EAE Severity Through the Modulation of Dendritic Cell and Other Immune Cell Functions. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 36–47, 4 jun. 2015.

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

GOOGLE. **Google Earth website**. 2019. Disponível em: <http://earth.google.com/>. Acesso em: 09 abr. 2023.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 393-407, jun. 2009.

GONSETTE, R. E. Self-tolerance in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Belgica**, v. 112, n. 2, p. 133–140, 24 mar. 2012.

GUARNEIRE, G. J. *et al.* Effect of *Anadenanthera colubrina* protease inhibitors as an antiinflammatory mediator. **Natural Product Research**, v. 35, n. 10, p. 1690–1695, 2021.

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

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

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

JACQUES, F. H.; LUBLIN, F. D. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. **Neurology**, p. 963, 2015.

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

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

JUNIOR, O. C. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of anti-inflammatory activity and free radical scavenging potential of leaves extract from *Anadenanthera colubrina*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4819–4823, 2021.

KAPOCS, G.; LASSMAN, H. Induction of persistently demyelinated lesion in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. **Journal of Neuroimmunology**, p. 219–224, 1993.

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

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

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

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

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

KRISHNAMOORTHY, G.; HOLZ, A.; WEKERLE, H. Experimental models of spontaneous autoimmune disease in the central nervous system. **Journal of Molecular Medicine**, v. 11, p. 1161–1173, 2007.

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

KUMAR, V. *et al.* **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 1320- 1321.

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

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

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

LEBAR, R. Demyelination and autoimmunity. **Pathological Biology**, p. 275–283, 1987.

LEE, Y. K. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency. **Brain Research**, v. 1250, p. 164–174, 2009.

LEWIS, G. *et al.* Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens of Kew**, 2005.

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

LIMA, R. D. F. *et al.* Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

LIMA, A. R. N. *et al.* Atividade antimicrobiana e anti-inflamatória da *Anadenanthera*

colubrina (Vell.) Brenan. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 1, p. e121911770, 1 jan. 2020.

LINHARES, J. F. P. *et al.* Etnobotânica das principais plantas medicinais comercializadas em feiras e mercados de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 39–46, set. 2014.

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

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

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

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

LOPES, E. R. *et al.* **Bogliolo Patologia**, 1987.

LPWG - THE LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. **A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny**, 2017.

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

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

MAGALHÃES, P. S. C. *et al.* Morfometria de frutos e sementes e métodos para superação da dormência de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e6010313034, 6 mar. 2021.

MAIA, C. M. A. *et al.* *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan as an inhibitor of HIV-1 BaL infection. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2021.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, n. July, 2019.

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

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

- MILO, R.; MILLER, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4–5, p. 518–524, 2014.
- MOJAVERROSTAMI, S. *et al.* A Review of Herbal Therapy in Multiple Sclerosis. *Adv Pharm Bull.* **Pharm Bulletin**, 2018.
- MOLOUDIZARGARI, M. *et al.* Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. **Pharmacognosy Reviews**, v. 7, n. 14, p. 199–212, 2013.
- MONTEIRO, S. S.; SIANI, A. C. Exsiccate Conservation in Herbaria: Contribution to the Management and Preservation. **Revista Fitos**, p. 24–37, 2009.
- MORIM, M. P. Anadenanthera in Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020.
- MOTA, G. S. *et al.* Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of Anadenanthera peregrina and Anadenanthera colubrina. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–14, 2017.
- MUNGER, K. L. *et al.* Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. **JAMA**, v. 296, n. 23, p. 2832, 20 dez. 2006.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- NOVARTIS. Biociências LTDA. GILENYA® cloridrato de fingolimode. 2015.
- OCAMPO, V. R.; CEBALLO, F.; HILA, A. M. J. Insecticidal Activity of Crude Ethanolic Extracts of Selected Philippine Plants against Diamondback Moth, *Plutella xylostella* Linnaeus. **Philippine Journal of Science**, v. 148, n. 1, p. 33–43, mar. 2019.
- OHL, K. *et al.* The transcription factor crem- $\alpha$  regulates inflammatory T cell subsets in juvenile idiopathic arthritis. **Pediatric Rheumatology**, v. 12, n. S1, set. 2014.
- OLECHOWSKI, C. J. *et al.* A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Pain**, v. 149, n. 3, p. 565–572, jun. 2010.
- OLIVEIRA, J. L. P. *et al.* Cuidados farmacêuticos na assistência ao paciente portador de esclerose múltipla. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 2, n. Esp. 1, p. 16- 16, 2019.
- OLSEN, S. A. Uma revisão da medicina complementar e alternativa (CAM) por pessoas com esclerose múltipla. **Occupational Therapy International**, 2009.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. e47, 2016.
- PASSOS, G. R. D. *et al.* Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. **Mediators of**

**Inflammation**, v. 2016, p. 1–11, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RODRIGUEZ, J. G., MAGDALENA, R. L. **Esclerosis Múltiple**: Ejercicios de Fisioterapia (En La Piscina en el Hogar). Salamanca: Schering, 2001. p. 1–36.

ROWLAND, L. P. M. **Tratado de neurologia**, 1997.

SANTOS, J. S. *et al.* Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 218–222, 2013.

SANTOS, L. V. **Síndrome de Cushing causada pelo excesso de glicocorticoides**, 2017.

SARINHO, E. S. C.; MELO, V. M. P. P. Glucocorticoid-induce bone disease: mechanisms and importance in pediatric practice. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 35, p. 207 – 2015.,

2017.

SCHLUESENER, H. J. *et al.* monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. **Journal of Immunology**, p. 4016–4021, 1988.

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

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

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

SILVA, D. R. *et al.* Anadenanthera Colubrina vell Brenan: Anti-Candida and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Brazilian Oral Research**, v. 33, p. 1–11, 2019.

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

SIMPSON, S. J. *et al.* Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, 2019.

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

SOBIERA, D. M. **Fingolimod**: uma potencial terapêutica oral para o tratamento da esclerose múltipla recidivante-remitente e a primeira da sua classe. p. 11–23, 2011.

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

SOUSA, E. A. *et al.* Ethnoknowledge of medicinal and mystical plants used by healers in Juazeiro do Norte, Ceara, Northeast Brazil. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 20, p. 154–166, 2021.

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

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

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



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

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

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

TRAUGOTT, U.; REINHERZ, E. L.; RAINE, C. S. Multiple sclerosis Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. **Journal of Neuroimmunology**, v. 4, n. 3, p. 201–221, jun. 1983.

TSUNODA, I. *et al.* Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: Induction of relapsing-remitting and progressive forms of EAE in H2S mouse strains. **Brain Pathology**, v. 10, p. 402–418, 2006.

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

VALE, K. D. S.; PEREIRA JUNIOR, E. B.; RODRIGUÊS, M. H. B. S. Uso de plantas medicinais em assentamento no sertão Paraibano. **Revista de Agroecologia no Semiárido**, v. 1, n. 1, p. 1, 17 abr. 2018.

VIANA, M. L. *et al.* Morfología y genética del árbol *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae) en Salta (noroeste de Argentina). **Revista de Biología Tropical**, v. 62, n. 2, p. 757, 5 jul. 2014.

VIEGAS, F. C. S. **Estudo clínico-histopatológico da encefalomielite auto-imune experimental em camundongos selvagens e deficientes para a apolipoproteína-E**, 2009.

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

WEBER, S. C. R. **Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos da casca do caule de *anadenanthera colubrina* (vell.) brenanvar. cebil (Griseb.)**. 2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Herbal Medicine research and global health: an ethical analysis. **Bulletin of the World Health Organization**, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/8/07-042820.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2022.

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

WILLING, A. *et al.* Production of IL-17 by MAIT Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Is Associated with IL-7 Receptor Expression. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 3, p. 974–982, 3 jan. 2018.

WLODARCZYK, A. *et al.* Comparison of microglia and infiltrating CD11c+ cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. **Journal of**

**Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, 25 mar. 2014.

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

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

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

ZIEMSEN, T.; ZIEMSEN, F. The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Autoimmun.** 2005.

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