



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira

**Controle da ativação do inflamassoma e do
estresse oxidativo pela vitamina D na
encefalomielite autoimune experimental (EAE)**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori
Coorientadora: Dra. Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento

**Botucatu
(2018)**

Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira

Controle da ativação do inflamassoma e do estresse oxidativo pela vitamina D na encefalomielite autoimune experimental (EAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa Adj Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento

Botucatu/SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Larissa Ragozo Cardoso de.

Controle da ativação do inflamassoma e do estresse oxidativo pela vitamina D na encefalomielite autoimune experimental (EAE) / Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Coorientador: Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento

Capes: 21100004

1. Encefalomielite autoimune experimental. 2. Barreira hematoencefálica. 3. Vitamina D. 4. Inflamassomos. 5. Estresse oxidativo.

Palavras-chave: Encefalomielite autoimune experimental; barreira hematoencefálica; estresse oxidativo; inflamassoma; vitamina D.



Dedicatória

"Eu aprendi...

- ... que a melhor sala de aula do mundo está aos pés de uma pessoa mais velha;*
- ... que ser gentil é mais importante que estar certo;*
- ... que é o amor; e não o tempo, que cura as feridas;*
- ... que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo o que Lhe pedimos;*
- ... que ignorar os fatos não os altera;*
- ... que cada pessoa que a gente conhece deve ser saudada com um sorriso;*
- ... que ninguém é perfeito até você se apaixonar por esta pessoa;*
- ... que algumas vezes tudo o que precisamos é de uma mão para segurar e de um coração para nos entender;*
- ... que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa é me cercar de gente mais inteligente que eu;*
- ... que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a;*
- ... que são os pequenos acontecimentos diários que tornam a vida espetacular; ..."*

(William Shakespeare)

A toda minha família, em especial, aos meus pais Nelsi e Cardoso, à minha avó Estela (in memoriam) e ao meu irmão Lucas

Dedico



Agradecimientos

A Deus, simplesmente, por tudo que me concedeu!

Aos meus pais amados, Nelsi e Cardoso, em quem me espelho, exemplos de caráter e dignidade, que sempre me ensinaram e mostraram, com muito amor e dedicação, o caminho a seguir, proporcionando todos os meios para minhas conquistas. Esta também é vocês!

Ao meu irmão Lucas, meus sobrinhos Ana Luiza e Bernardo. Motivos de meu orgulho e admiração... amo vocês!

À minha avó Estela (in memoriam), minha estrela mais brilhante, em sua imensa sabedoria me ensinou a importância dos estudos e do conhecimento. Meu amor eterno!

Ao meu namorado Filipe, obrigada pelo carinho, companheirismo e apoio, amo você!

À minha orientadora, Profa. Dra. Alexandrina Sartori, exemplo de profissional e pessoa, por me oferecer oportunidades de crescimento e acreditar no meu trabalho. Obrigada pela amizade, orientação, incentivo, dedicação e disponibilidade sempre!

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Luiz Alquati, Ivana Castilho, Ana Cláudia e Lulinha, por me apoiarem nas horas em que me fiz ausente, pelas risadas e conversas diárias!

*Amigos do Laboratório de Vacinas e Imunomodulação, Sofia, Juliana, Evelyn e Patricia.
Obrigada pelo convívio, amizade, ajuda e momentos de descontração!*

Às amigas Thais e Luiza. A cumplicidade, carinho e amizade de vocês.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, que permitiram que eu desenvolvesse meu doutorado neste departamento.

Ào Professor Ramon Kaneno, do Laboratório de Citometria de Fluxo, Botucatu.

Ào Professor João Pessoa de Araújo Junior e professora Ana Angélica, pelo desprendimento em nos abrir as portas do Laboratório de Virologia e Bioquímica.

À amigos que estão sempre por perto e aos que seguiram outros rumos, mas estão sempre em meu pensamento. Tenham certeza que os tenho em mim, aprendi muito com vocês.

Ào departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem-Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo n° 2013/26257-8) e por viabilizar a realização deste estudo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho!

E principalmente aos animais de experimentação.

Que através de suas vidas nos permitiram contribuir significativamente para o desenvolvimento da pesquisa e do ensino na área da ciência e saúde. Espero que nossos resultados possam contribuir de alguma forma para aprimorar o conhecimento e ajude a melhorar a vida dos pacientes com Esclerose Múltipla.



Epigrafe

"Tudo é ousado para quem nada se atreve". Fernando Pessoa.

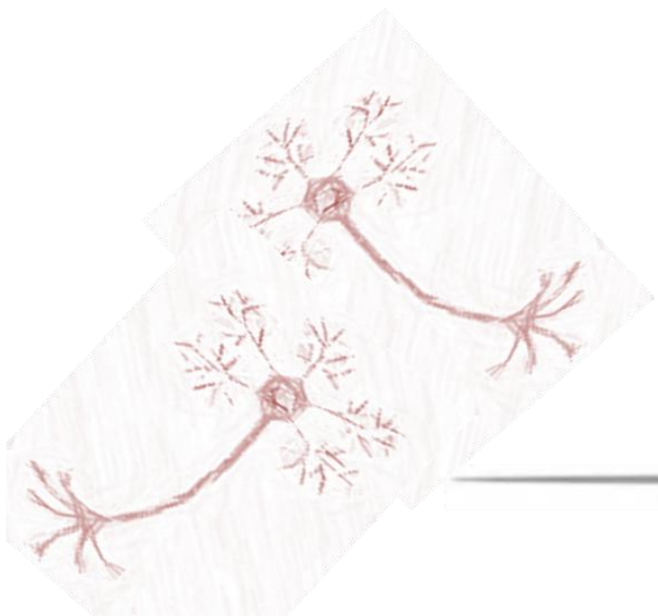


Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica e desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC) que desencadeia diferentes graus de incapacidade física e cognitiva. Os tratamentos para a EM são baseados principalmente em drogas imunomoduladoras visando redução da gravidade e da frequência de recidivas, uma vez que não há cura para a doença. Estudos em modelo experimental de EM, denominado encefalomielite autoimune experimental (EAE) têm demonstrado o efeito imunomodulador da vitamina D (Vit D3) tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Neste contexto, nosso objetivo foi avaliar se a intervenção precoce com Vit D3 é capaz de bloquear a neuroinflamação em um modelo experimental de EM. Para isto, camundongos C57BL/6 fêmeas foram imunizados com MOG (glicoproteína da mielina do oligodendrócito) associada ao Adjuvante Completo de Freund e tratadas com Vit D3 por via intraperitoneal. A Vit D3 diminuiu, de forma significativa, a incidência e o escore clínico da doença. Este efeito protetor foi acompanhado da diminuição de entrada de linfócitos no SNC e também de redução no processo de desmielinização e expressão de MHCII em macrófagos e micróglia. A eficácia da Vit D3 também foi associada com controle local do estresse oxidativo, ou seja, nos animais tratados ocorreu normalização dos níveis de peroxidação lipídica e de proteína carbonil e também de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase). A terapia com Vit D3 também determinou redução significativa na expressão gênica de NLRP3, caspase 1 e IL-1 β locais, que são marcadores típicos de ativação do inflamassoma. Também constatamos que a terapia precoce com Vit D3 normalizou a barreira hematoencefálica, principalmente no nível da medula espinhal. Estes

resultados indicam que uma intervenção precoce com Vit D3 é capaz de controlar o processo neuroinflamatório que caracteriza a imunopatogênese da EAE e poderia, portanto, ser explorada como terapia adjunta em pacientes com EM.

Palavras chave: Encefalomielite autoimune experimental, barreira hematoencefálica, vitamina D, inflamassoma, estresse oxidativo.



Abstract

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic and demyelinating inflammatory disease of the Central Nervous System (CNS) that triggers different degrees of physical and cognitive disability. Treatments for MS are mainly based on immunomodulatory drugs that reduce severity and frequency of relapses. Studies in an experimental model of MS, called experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), have demonstrated the immunomodulatory effect of vitamin D (Vit D3) in both innate and adaptive immunity. In this context, our objective was to evaluate whether early intervention with Vit D3 was able to block neuroinflammation in EAE. Encephalomyelitis was induced in female C57BL / 6 mice by immunization with MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) associated with Freund's Complete Adjuvant and two doses of pertussis toxin. Mice were treated with Vit D3 intraperitoneally. Treatment significantly decreased the incidence and clinical score of the disease. This protective effect was associated to decreased lymphocyte infiltration in the CNS and also reduced demyelination and MHCII expression in macrophages and microglia. Vit D3 also determined local control of oxidative stress, that is, normalization of the levels of lipid peroxidation and carbonyl protein and also of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase). Vit D3 therapy reduced NLRP3, caspase-1 and local IL-1 β mRNA expression in the CNS. In addition, this precocious Vit D3 therapy normalized the blood-brain barrier, mainly at the spinal cord level. These results indicate that an early intervention with Vit D3 is able to control the neuroinflammatory process that characterizes the immunopathogenesis of EAE and could therefore be explored as adjunctive therapy in MS patients.

Keywords: Experimental autoimmune encephalomyelitis, blood-brain barrier, vitamin D3, inflammasome, oxidative stress.

Resumo**Abstract**

Capítulo 1	19
1.Introdução	20
1.1. Esclerose múltipla	21
1.2. Encefalomielite autoimune experimental.....	25
1.3. Vitamina D.....	26
1.4. Inflamassoma	29
1.5. Estresse Oxidativo	32
1.6. Racional do projeto	37
2.Objetivos	38
2. Objetivo Geral:	39
2.2. Objetivos Específicos:	39
3.Protocolo experimental	40
4.Material e métodos.....	42
4.1. Animais	43
4.2. Indução de EAE e avaliação clínica	43
4.3. Administração de vitamina D3.....	43
4.4. Análise histopatológica de inflamação e desmielinização	44
4.5. Ensaio de permeabilidade da barreira hematoencefálica com NaFLU.....	44
4.6. Isolamento de células mononucleares do sistema nervoso central	45
4.7. Imunofenotipagem.....	45
4.8. Quantificação do estresse oxidativo no SNC	46
4.9. Expressão gênica do inflamassoma NLRP3 por PCR- tempo real	47
4.10. Análise estatística	50
5.Referencias bibliográficas	51
Capítulo 2	62
6. Artigo.....	63
Conclusão	87

Capítulo 1



1. Introdução

1.1. Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica e desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC) que determina diferentes graus de incapacidade física e cognitiva ⁽¹⁾. A EM é caracterizada por episódios agudos ou surtos da doença com perda gradual e progressiva da função neurológica. Pode ser classificada em quatro subtipos: remitente-recorrente (RR), progressiva primária (PP), progressiva secundária (PS) e progressiva recorrente (PR), sendo o primeiro subtipo a forma mais prevalente, ocorrendo em 85% dos casos ⁽²⁾.

A doença é mais prevalente em adultos jovens, em idade economicamente ativa, acometendo mais mulheres do que homens, na proporção 2:1 ⁽³⁾. Globalmente a prevalência é de 30 casos a cada 100.000 habitantes, sendo mais frequente na Europa (80 a cada 100.000), seguida pelo Mediterrâneo Oriental (14,9 a cada 100.000), Continente Americano (8,3 a cada 100.000), e com menor prevalência na África (0,3 a cada 100.000) ⁽⁴⁾. No Brasil a prevalência é de 18 casos a cada 100 mil habitantes, sendo que a cidade de Santa Maria (RS) é a cidade brasileira com maior incidência, com média de 27 casos por 100 mil habitantes, seguida por Rio de Janeiro (20), Belo Horizonte (18), Botucatu (17), Santos (15), São Paulo (15), Londrina (14) e Uberaba (12) ⁽⁵⁾.

A etiologia da EM ainda não está esclarecida, mas acredita-se que fatores genéticos e ambientais podem afetar seu desenvolvimento. Um forte candidato genético responsável pela maior susceptibilidade é o alelo HLA-DRB1*1501 ⁽⁶⁾. Outros aspectos relevantes determinados através de estudos epidemiológicos são os fatores ambientais tais como infecção pelo vírus Epstein–Barr, o hábito de fumar e a deficiência de vitamina D3 (VitD) ⁽⁷⁾. Os trabalhos realizados por Munger *et al.*, ⁽⁸⁾ mostraram que os níveis séricos de vitamina D3 são significativamente menores em

pacientes com EM em comparação com os níveis encontrados em indivíduos saudáveis. Também tem sido demonstrado que a suplementação com vitamina D está associada com redução do risco de desenvolver a doença ^(8,9).

Diversos estudos indicam que se trata de uma doença autoimune iniciada por linfócitos T auto-reativos específicos para mielina. Esses linfócitos T auto-reativos são ativados em órgãos linfoides secundários por mimetismo molecular ou de forma não específica por “bystander activation”. Independentemente dos eventos exatos que desencadeiam a EM, as células ativadas na periferia atingem o SNC através da barreira hematoencefálica (BHE), espaço subaracnóideo ou através da barreira do líquido cefalorraquidiano. As lesões agudas apresentam um alto conteúdo de macrófagos e células T CD8⁺ e, em menor proporção, células T CD4⁺ (do tipo Th1 e Th17), células B e plasmócitos⁽¹⁰⁾. A migração através destas barreiras é mediada por interação entre moléculas de adesão presentes na superfície das células imunes e moléculas de superfície das células endoteliais; por exemplo, LFA-1 e $\alpha 4\beta 1$ -integrinas das células T e ICAM-1 e VCAM-1 de células endoteliais. VCAM-1 é expressa constitutivamente e sua expressão é aumentada por citocinas. Este mecanismo é utilizado principalmente por células Th1. Por outro lado as células Th17 interagem, preferencialmente, através de seus receptores para quimiocinas (CCR6 e CCL20) com quimiocinas correspondentes expressas constitutivamente, em pequenas quantidades, nas células endoteliais. Ao entrar no SNC, essas células T são reativadas por células dendríticas (CDs) ou macrófagos, que apresentam os peptídeos originados da bainha de mielina através do MHC de classe II⁽¹¹⁾. Dessa forma, essas células ativadas passam a produzir citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-17, causando danos à mielina. Além disso, estas citocinas podem ativar a micróglia e macrófagos. Estudos sugerem que estes fagócitos internalizam e

degradam a bainha de mielina, dando início ao processo inflamatório e desmielinização⁽¹²⁻¹⁴⁾ através da liberação de vários mediadores pró-inflamatórios e radicais livres como superóxido, hidroxil, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. As células T citotóxicas CD8+ destroem a mielina pela produção de perforina-granzima, resultando na liberação de mais auto-antígenos o que reforça a continuidade do processo inflamatório⁽¹⁵⁾.

A desmielinização é amplamente localizada nas lesões focais no início da EMRR, de modo que outras áreas da substância branca parecem normais. No entanto, ao longo do tempo, as infiltrações de células T e B tornam-se mais difusas e a lesão axonal é mais disseminada, levando à atrofia de matéria branca e cinzenta⁽¹⁶⁾. Com a progressão da doença, o infiltrado de células periféricas diminui, e neste estágio os processos inflamatórios são predominantemente mediados pela ação das células da microglia residentes no SNC⁽¹⁷⁾.

As células T regulatórias (Tregs) constituem um componente chave para a tolerância periférica, suprimindo células T auto reativas, isto é, aquelas que escaparam do processo de seleção negativa no timo, como por exemplo, aquelas que reconhecem a proteína básica de mielina (MBP). As Tregs naturais (nTregs) compreendem 5-10% de todos os timócitos CD4⁺CD8⁻ e na periferia representam aproximadamente 10% de toda a população de células T CD4⁺. As células T regulatórias induzidas (iTregs) se diferenciam a partir de células auxiliares T CD4⁺ *naïve* durante a resposta imune periférica. Estas células inibem a proliferação e/ou a produção de citocinas por outras células. Esta capacidade supressora requer o contato célula-célula e/ou produção de citocinas inibitórias, tais como, IL-10, TGF- β e IL-35. As Tregs expressam marcadores de superfície como o CD4, CD25, CD5, CD49d, CD69, CD103, CD152 (CTLA-4), CD357 (GITR) e o fator de transcrição

nuclear *Forkhead box P3* (FoxP3), o qual parece ser fundamental para o desenvolvimento e função desta capacidade supressora, sendo considerado o marcador molecular mais específico desta subpopulação ⁽¹⁸⁾. Essas células desempenham um papel vital na regulação de processos autoimunes. Estudos demonstram que uma mutação no gene FoxP3, determina diferenciação defeituosa de células Tregs contribuindo assim para o desenvolvimento de processos imunopatológicos. Embora as células T regulatórias mais estudadas sejam aquelas que expressam Foxp3, também há populações de Tregs que não expressam Foxp3. Estes incluem três tipos principais: células Tr1, uma população ativada na periferia após estimulação antigênica na presença de IL-10 e que expressam os marcadores de superfície LAG-3 (gene de ativação de linfócitos 3) e CD49b sem expressar Foxp3 e CD25; Células Th3, que também são diferenciadas na periferia e medeiam a supressão celular secretando a citocina TGF- β ; e finalmente, Tregs CD8⁺⁽¹⁹⁾, descritas como células T de memória antígeno-específica com propriedades Treg, que podem regular a resposta imune pela produção de IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ , embora os mecanismos exatos dessa supressão ainda sejam amplamente desconhecidos⁽²⁰⁾.

A contribuição dessas células para a autoimunidade pode ocorrer por sua baixa frequência ou pela perda ou diminuição de sua função. O papel das células Tregs na EM é bastante controverso. Embora existam relatos sobre reduzida frequência de nTregs em pacientes com EM, na maioria dos estudos é descrita uma frequência semelhante à observada em indivíduos saudáveis. No entanto, vários estudos funcionais usando ensaios de supressão *in vitro* têm demonstrado deficiências na atividade de células Tregs nestes pacientes⁽¹¹⁾.

Os tratamentos para EM são baseados principalmente em drogas

imunomoduladoras visando redução da gravidade e da frequência de recidivas, uma vez que não há cura para a doença ⁽²¹⁾. Os corticosteroides são utilizados na fase aguda da doença, já as drogas imunomoduladoras são utilizadas em pacientes com quadros de exacerbação e remissão da doença ^(22,23). Existem diferentes drogas imunomoduladoras com diferentes mecanismos de ação, por exemplo, o IFN- β , o acetato de glatiramer, ⁽²³⁾, natalizumabe ⁽²⁴⁾ e o fingolimode, mais recentemente disponibilizado para uso clínico ^(25,26). Apesar da variedade de condutas terapêuticas aprovadas para o tratamento da EM, essas medicações possuem custo muito elevado, estão associadas com vários efeitos colaterais e não são eficazes em todos os pacientes. Portanto, ainda há a necessidade de se investigar novas estratégias terapêuticas.

1.2. Encefalomielite autoimune experimental

Encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo animal mais amplamente aceito de EM. Diferentes tipos de EAE têm sido desenvolvidos a fim de investigar os aspectos patogênicos, clínicos e terapêuticos da EM ⁽²⁷⁾. Inicialmente, pela facilidade de ser purificada em grandes quantidades, a MBP foi o antígeno mais amplamente utilizado e os estudos foram restritos aos camundongos SJL (H-2s) e PL/J (H-2u) ^(28,29). Atualmente, o modelo mais comum de indução de EAE baseia-se na injeção de peptídeos encefalitogênicos, principalmente MOG₃₅₋₅₅ e PLP₁₃₉₋₁₅₁, associados ao Adjuvante Completo de Freund (ACF), contendo óleo mineral e a cepa H37RA de *Mycobacterium tuberculosis*, seguida por injeções intraperitoneais de toxina pertussis. A evolução clínica nos diferentes modelos depende principalmente da fonte antigênica e da genética das cepas de camundongos utilizadas ⁽³⁰⁾.

De forma semelhante à doença humana, na EAE também ocorre aumento de células Th1 e Th17 auto reativas contra antígenos da mielina, aumento de CDs e macrófagos ativados no SNC, maior produção de mediadores inflamatórios e diminuição na frequência das células Tregs na periferia⁽³¹⁾. A ativação das células T auto-reativas na encefalomielite autoimune experimental ocorre em linfonodos drenantes da pele após a imunização subcutânea de animais com antígenos de mielina. As células T CD8+ são raramente encontradas em lesões na EAE⁽³²⁾.

Camundongos C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅ desenvolvem uma doença aguda com perda de peso corporal e paralisia. Estas características estão associadas com um processo inflamatório e desmielinizante acentuado no SNC. Após esta fase aguda os animais desenvolvem uma doença crônica que perdura por pelo menos 45 dias⁽³³⁾. De acordo com Murphy *et al.*,⁽³⁴⁾ a partir do sétimo dia após a indução da EAE já ocorre aumento significativo de linfócitos produtores de IL-17 (CD3+CD4+IFN- γ -IL-17+) no cérebro e na medula espinhal de camundongos C57BL/6 com EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅. O modelo de EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6 tem sido bastante explorado, especialmente em estudos envolvendo procedimentos imunomoduladores e terapêuticos.

1.3. Vitamina D

A prevalência de EM apresenta um padrão geográfico bem definido; aumenta com o incremento de latitude em ambos os hemisférios⁽³⁵⁾, locais estes onde ocorre uma diminuição da exposição à luz solar⁽³⁶⁾. As maiores quantidades de Vit D3 são sintetizadas pela pele exposta à luz solar. A radiação ultravioleta é usada para converter 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D3. Em seguida, a pré-vitamina D3 sofre uma isomerização térmica espontânea em colecalciferol⁽³⁷⁾. Devido ao papel

essencial da luz solar, esta vitamina tem sido chamada de "vitamina do sol" ⁽³⁸⁾. Quantidades menores de vitamina D podem ser obtidas a partir da ingestão de certos alimentos como cogumelos, peixe, leite e ovos ⁽³⁹⁾. Para se tornar um hormônio metabolicamente ativo, colecalciferol precisa ser hidroxilado duas vezes. A primeira hidroxilação ocorre no fígado e converte o colecalciferol em 25 dihydroxyvitamin D (calcidiol) através da enzima 25-hidroxilase ⁽⁴⁰⁾. Depois disso, calcidiol liga-se a uma molécula carreadora, conhecida como proteína transportadora de vitamina D, para ser transportado sistemicamente aos tecidos que expressam 1- α -hidroxilase (CYP27B1) ⁽⁴¹⁾. O nível plasmático de calcidiol é geralmente usado como parâmetro do nível de Vit D ⁽⁴²⁾. No rim, a segunda hidroxilação gera o metabólito bioativo denominado 1,25-di-hidroxitamina D3 (calcitriol) catalisada por CYP27B1. O calcitriol possui um papel importante na homeostasia da maioria das funções metabólicas e na homeostasia do cálcio e do metabolismo ósseo. Dessa forma, a hipocalcemia estimula as glândulas paratireóides a liberar o paratormônio que ativa a função da enzima CYP27B1 renal, resultando na produção de calcitriol. Além disso, este hormônio estimula a maturação de osteoclastos os quais liberam cálcio e fosfato a partir dos ossos. O calcitriol também reduz a excreção renal do cálcio e aumenta a absorção de cálcio dos alimentos no intestino. Quando são alcançados níveis normais de cálcio, o calcitriol regula por feedback negativo a glândula paratireoideia, diminuindo a atividade CYP27B1 para evitar intoxicação por VITD ⁽⁴³⁾. Além dos rins, 1 α -hidroxilase tem sido relatada em muitos tecidos, incluindo osso, placenta, próstata e glândula paratireóide. Além disso, várias células cancerosas e células imunes, tais como macrófagos, linfócitos T e CD4 são também capazes de produzir esta enzima ^(44,45). A forma bioativa de VitD tem seus efeitos biológicos mediados pelo receptor nuclear de vitamina D (VDR) ^(46,47). De forma

similar à 1 α -hidroxilase, o VDR também está presente em células do sistema imune (macrófagos, CDs e linfócitos T e B ativados). A descoberta da expressão de VDR em monócitos e posteriormente, em células apresentadoras de antígeno (APCs) desencadeou estudos que mostraram um importante papel regulador da vitamina D na imunidade inata bem como na adaptativa ⁽⁴⁸⁾.

Na imunidade inata ela aumenta as propriedades antimicrobianas de monócitos e macrófagos⁽⁴⁹⁾. O papel regulador da 1,25 (OH) 2D3 na imunidade adaptativa foi principalmente atribuído aos seus efeitos sobre as CDs. *In vitro* a exposição a 1,25 (OH) 2D3 inibiu a maturação de CDs reduzindo a expressão de marcadores tais como CD1a, MHC II, CD40, CD80 e CD86 ⁽⁵⁰⁾. Além disso, a 1,25 (OH) 2D3 modula a produção de citocinas pelas DCs, inibindo, por exemplo, a produção de IL-12 e IL-23 as quais induzem a diferenciação de Th1 e Th17, respectivamente. Classicamente, tem sido descrito que a 1,25 (OH) 2D3 aumenta também a secreção de IL-10, uma citocina com propriedades anti-inflamatórias muito bem estabelecidas ⁽⁵¹⁾. Os efeitos da 1,25 (OH) 2D3 em células T incluem inibição da proliferação, da produção de IL-2 e IFN- γ ⁽⁵²⁾ e também inibição da diferenciação de células Th17 ⁽⁵³⁾. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a 1,25 (OH) 2D3 normalmente induz células Tregs Foxp3+ ⁽⁵⁴⁾. O papel benéfico de 1,25 (OH) 2D3 em modelos experimentais de doenças autoimunes, como a uveíte autoimune experimental, EAE e diabetes tem sido claramente demonstrado ⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾. Vem sendo intensamente investigado o mecanismo de ação da 1,25 (OH) 2D3 sobre o sistema imunológico. Chang *et al.*,⁽⁵⁷⁾, por exemplo, mostraram que o efeito benéfico desta substância na EAE é mediado, pelo menos em parte, por inibição da diferenciação e da migração das células Th17 para o SNC. A contribuição de CDs tolerogênicas induzidas por 1,25(OH)2D3 no controle da EAE também foi claramente demonstrado

por Farias et al., 2013⁽⁵⁸⁾. Estes autores observaram que tanto a administração, in vivo, de 1,25 (OH) 2D3 quanto a transferência de CDs imaturas IDO+ induzidas por 1,25 (OH) 2D3, reduziram significativamente a gravidade da EAE. Além disso, ocorre expressão de VDR no SNC e a atividade da 1 α -hidroxilase (enzima que converte a forma circulante da vitamina D na forma ativa) foi demonstrada também em neurônios e na microglia, enfatizando efeitos locais, parácrinos e autócrinos da vitamina D no SNC⁽⁶⁰⁾.

1.4. Inflamassoma

Muitas das citocinas pró-inflamatórias são produzidas pelo sistema imune inato através da ativação de uma variedade de receptores que reconhecem diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) assim como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) produzidos durante a lesão de tecidos. Dentre estes receptores celulares destacam-se os receptores semelhantes à Toll (TLRs, toll-like receptors) e os receptores de ligação a nucleotídeos contendo domínios com sequência repetida de resíduos do aminoácido leucina (NLRs)⁽⁶¹⁻⁶³⁾. Enquanto os TLRs são receptores usualmente expressos na membrana celular, os NLRs são sensores citoplasmáticos que monitoram compartimentos intracelulares buscando sinais de infecção ou injúria tecidual. Através destes receptores as células são capazes de regular fagocitose, atividade microbicida, produção de citocinas e diferenciação de CDs, determinando assim um elo entre a imunidade inata e a adaptativa^(64,65).

Existem mais de 20 genes NLR em humanos e mais de 30 em camundongos, os quais codificam proteínas citosólicas caracterizadas pela presença de um domínio central de ligação a nucleotídeo e oligomerização (NACHT), o qual é flanqueado por

uma porção C-terminal com repetições ricas em leucina (LRRs) e um domínio N-terminal responsável pelo recrutamento da caspase (CARD) ou domínio pirina (PYD)⁽⁶⁶⁾. Os LRRs estão ligados com auto-regulação e os domínios CARD e PYD medeiam interações proteína-proteína para consequente sinalização. O domínio NACHT, comum para todos os NLRs, permite ativação de sinais via oligomerização dependente de ATP. Através dos domínios NACHT os NLRs podem ser divididos em 3 subfamílias: os NOD (NOD1, NOD2, NOD3/NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA), os NLRPs (NLRP1 ao 14) e a subfamília IPAF (NLRC4 e NAIP)⁽⁶⁷⁾. As classes mais extensivamente estudadas de NLRs são os NLRs formadores de inflamassoma e entre estes NLRs estão os NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRC5, NLRP6, NLRP7, NLRP12 e AIM2. O inflamassoma é uma plataforma formada por um complexo de proteínas que contém principalmente a enzima proteolítica caspase⁽⁶⁶⁻⁷⁰⁾, responsável pela maturação de citocinas pró inflamatórias como IL-1 β , IL-18 e IL-33⁽⁷¹⁻⁷⁶⁾. A ativação desses NLRs também induz a produção de IFN- γ e NO⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Desta forma, após sua ativação, os NLRs se oligomerizam através do domínio NACHT. Essa oligomerização facilita recrutamento de pró-caspase 1 através da interação entre domínio CARD e a pró-caspase 1. No entanto, alguns NLRs não possuem o domínio CARD e então sinalizam através do domínio PYD e da molécula adaptadora ASC. A porção PYD da adaptadora ASC interage com a porção PYD do NLRs enquanto que a porção CARD da ASC recruta pró-caspase 1. Uma vez que a pró-caspase 1 é recrutada em um inflamassoma, ocorre a clivagem da pró-caspase 1 nos fragmentos p35 e p10^(77,78). Inflamassomas contendo ASC induzem autoproteólise de caspase-1 com consequente síntese de citocinas, enquanto que o complexo caspase-1 independente de ASC determina morte celular por piroptose⁽⁷⁹⁾.

O inflamassoma NLRP3 (figura 1) é atualmente o que se encontra melhor caracterizado e é composto por três proteínas diferentes: NLRP3, proteína adaptadora ASC e pro-caspase-1. Este detecta diferentes estímulos, incluindo vírus, bactérias, fungos, ATP extracelular, ácido úrico ⁽⁸⁰⁻⁸³⁾ e vários irritantes ambientais, tais como sílica e amianto entre outros ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾. Estudos demonstram que espécies reativas do oxigênio (ROS), catepsinas de lisossomos ou o influxo de potássio também podem ativar o inflamassoma NLRP3 ^(80, 86-92). No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o inflamassoma NLRP3 é ativado por estas substâncias ainda não está claro.

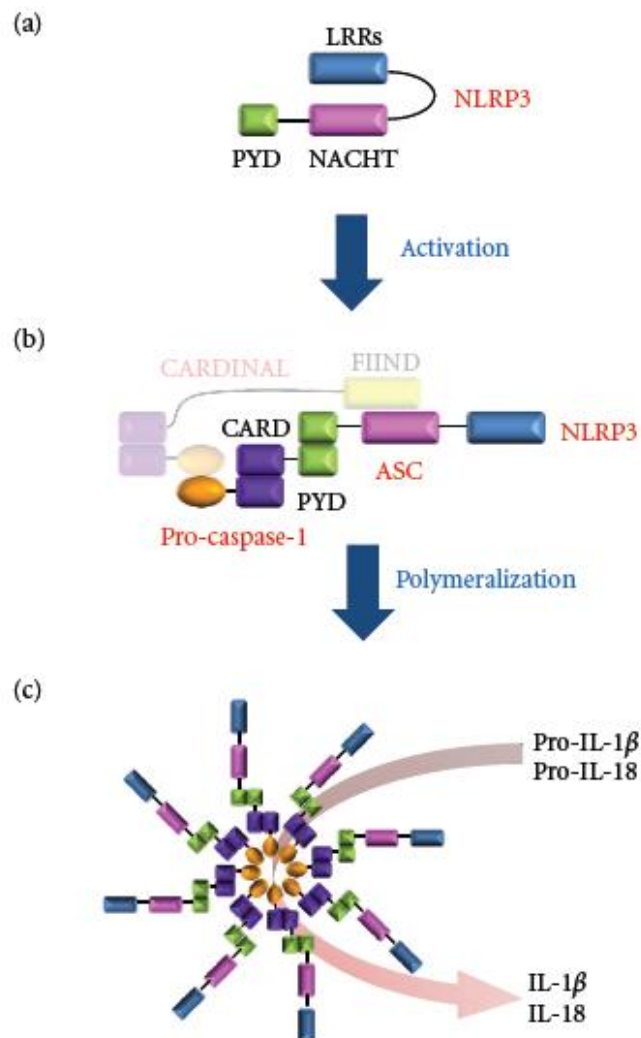


Figura 1: Estrutura e ativação do inflamassoma NLRP3. (a) Inflamassoma NLRP3 sem ativador. (b) Abertura da molécula do inflamassoma pelo ativador, para que

ocorra a interação com ASC. Interação de ASC com pró caspase-1. (c) Polimerização de NLRP3. Indução da maturação de IL- β e IL-18 por caspase-1⁽⁹³⁾.

No contexto deste projeto acredita-se que a formação do inflamassoma NLRP3 esteja relacionada com a progressão da EM, visto que as citocinas sintetizadas por esse complexo proteico, como IL-1 β e IL-18, atuam na diferenciação e manutenção das células Th1 e Th17, principais subpopulações celulares responsáveis pela patogênese da doença⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾. Além disso, há uma elevada expressão de caspase-1 nas lesões no SNC e nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com EM^(97,98). Camundongos com EAE exibem elevada expressão de NLRP3 na medula espinhal enquanto que camundongos NLRP3^{-/-} apresentam menor gravidade da doença, decorrente da redução do infiltrado inflamatório, menor produção de citocinas encefalitogênicas e preservação da bainha de mielina⁽⁹⁹⁾. Além disso, estudos têm demonstrado que a via do inflamassoma NLRP3 induz desmielinização tanto no modelo de EAE quanto em modelo de doença desmielinizante induzida quimicamente^(100,101). No caso da EAE a ativação do inflamassoma tem sido associada com o aumento da migração de células T auxiliares e APCs para o SNC, induzindo a progressão da doença⁽¹⁰²⁾. A importante contribuição do inflamassoma para o desenvolvimento da EM/EAE é reforçada por estudos que demonstram que camundongos deficientes em caspase-1 são mais resistentes à EAE^(102,103).

1.5. Estresse Oxidativo

Durante o metabolismo celular, a geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Esses

radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; importante para várias funções celulares. Porém, a produção excessiva pode desencadear danos oxidativos⁽¹⁰⁴⁾. Tais processos químicos ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem ser especialmente favorecidos pelos íons ferro e cobre⁽¹⁰⁵⁾, sendo que na mitocôndria, a cadeia transportadora de elétrons é a principal fonte geradora de radicais livres⁽¹⁰⁶⁾. A enzima catalisadora dessa reação é a oxidase do citocromo c. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, esta enzima oxida quatro moléculas de citocromo c removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O₂ para formar água. A ação da oxidase do citocromo c controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias é desviado para outra via metabólica e reduzido de forma univalente, dando origem aos radicais livres⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾.

Os principais radicais livres gerados pela redução do O₂ são: superóxido (O₂•), hidroxila (OH•) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Embora o H₂O₂, não seja considerado um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie altamente reativa, sendo considerado o mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H₂O₂ tem vida longa e é capaz de atravessar às membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Além da capacidade do O₂• em participar de reações de geração de OH•, pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico (NO•), gerar a espécie reativa de nitrogênio denominada peroxinitrito (ONOO), também

potencialmente reativa. Esses radicais podem também ser produzidos pela ação das enzimas NADPH oxidase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases*) e óxido nítrico sintase induzível (iNOs), respectivamente. Essas se referem às proteínas transmembrana que têm, por excelência, a função de transferir os elétrons através das membranas celulares ^(106,108,109). As membranas celulares são constituídas por ácidos graxos poli-insaturados; a oxidação dessa camada lipídica acarreta intensa produção de radicais livres, tais como, alcoxila (LO•) e peroxila (LO₂•). O radical OH•, por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal iniciador de tal processo⁽¹¹⁰⁾.

Além das espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio serem bioprodutos naturais de fosforilação oxidativa ^(111,112), também podem ser gerados por células inflamatórias ativadas, incluindo macrófagos e microglia ⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾. Uma vez que macrófagos ativados e microglia são importantes fontes de ROS, estes radicais ainda podem atuar como ativadores de fatores de transcrição (NF-κB), aumentando a expressão de genes pró-inflamatórios ⁽¹¹⁶⁾.

Para contrabalancear o efeito deletério destes radicais livres existe um sistema de defesa antioxidante. Esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz ⁽¹¹⁷⁾. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos ^(118,119). Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda,

favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) ^(105,120).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não- radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos ^(107,108). As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de H₂O₂. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, culmina na geração do radical OH•, contra o qual não há sistema enzimático de defesa ^(107,108).

O sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. Entre os minerais destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio ^(119,121).

Dessa forma, a instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação, em potencial, é o dano oxidativo contra células e tecidos ⁽¹²¹⁾. A cronicidade do processo em questão tem implicações

relevantes sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer ⁽¹⁰⁶⁾.

Estudos enfocando a contribuição do estresse oxidativo na MS têm aumentado dramaticamente nos últimos anos ⁽¹²²⁻¹²⁴⁾. Investigações recentes descrevem o importante papel do estresse oxidativo nos processos de inflamação e desmielinização ^(125,126). Tem sido demonstrado que as espécies reativas são produzidas pela micróglia, após serem ativadas por linfócitos T, especialmente células Th17. Dessa forma, esses radicais livres atacam diferentes moléculas do SNC causando danos do tecido neural. Neste estudo, os autores também observaram uma diminuição nos níveis de antioxidantes no plasma de pacientes com MS, o que poderia ser atribuído ao alto consumo dos mesmos pelos radicais livres ^(127,128).

As membranas celulares são mais susceptíveis à ação das espécies reativas do oxigênio (EROs) em decorrência da presença de grande quantidade de fosfolípidios, os quais sofrem lipoperoxidação ⁽¹²⁹⁾. Elevados níveis de EROs podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, facilitando a migração de células ativadas para o SNC ⁽¹³⁰⁾. Autópsias revelaram a presença de lipídeos oxidados nas bainhas de mielina em regiões de lesão ativa de pacientes com EM ⁽¹³¹⁾. Modelos experimentais também comprovam a participação das EROs na patogênese da EAE ⁽¹³²⁾. Macrófagos e CDs de ratos Lewis na fase aguda da doença produzem níveis elevados de EROs e o tratamento com catalase, um antioxidante que atua inibindo a formação de H₂O₂, reduz a gravidade da doença ⁽¹³³⁾.

1.6. Racional do projeto

A EM é uma doença autoimune grave que acomete o SNC. As terapias para esta patologia são baseadas em drogas imunomoduladoras com alto custo e com vários efeitos colaterais, por estas razões estudos de novas terapias se fazem necessárias. Diversos trabalhos têm demonstrado o papel benéfico da Vit D3 na EAE. Os efeitos benéficos desta vitamina estão relacionados com sua capacidade imunomoduladora como, por exemplo, inibição da maturação de CDs e da diferenciação de células Th17 e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como por exemplo a IL-10. Poucos estudos mostram, entretanto, seu efeito terapêutico no controle na neuroinflamação na EAE. A participação do inflamassoma NLRP3 e do estresse oxidativo vêm sendo demonstrado neste processo neuroinflamatório. A ativação do inflamassoma pode determinar aumento da produção de IL- β , citocina importante para diferenciação de células Th17 e indução da produção de citocinas inflamatórias envolvidas na doença, as quais podem aumentar a ativação celular e a permeabilidade da BHE. Este aumento da ativação celular também desencadeia a produção de radicais livres os quais, no caso do alvo ser o SNC, determinam lipoperoxidação da bainha de mielina, agravando a doença. Neste contexto e considerando adicionalmente a necessidade de novas estratégias terapêuticas capazes de controlar a neuroinflamação, nossa hipótese de trabalho é que a terapia precoce com a Vit D3 na EAE seja capaz de reduzir, pelo menos parcialmente, a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a ativação do inflamassoma, do estresse oxidativo e de células residentes e infiltrantes no SNC, controlando assim o processo inflamatório local e a conseqüente neurodegeneração.



2. Objetivos

2. Objetivo Geral:

Determinar se a intervenção precoce com Vit D3 é capaz de bloquear a neuroinflamação em um modelo experimental de EM.

2.1. Objetivos Específicos:

Avaliar se intervenção precoce com Vit D3:

2.1.1. Controla o desenvolvimento clínico da EAE.

2.1.2. Reduz o infiltrado celular e a desmielinização na medula lombar.

2.1.3. Modula o perfil celular no SNC.

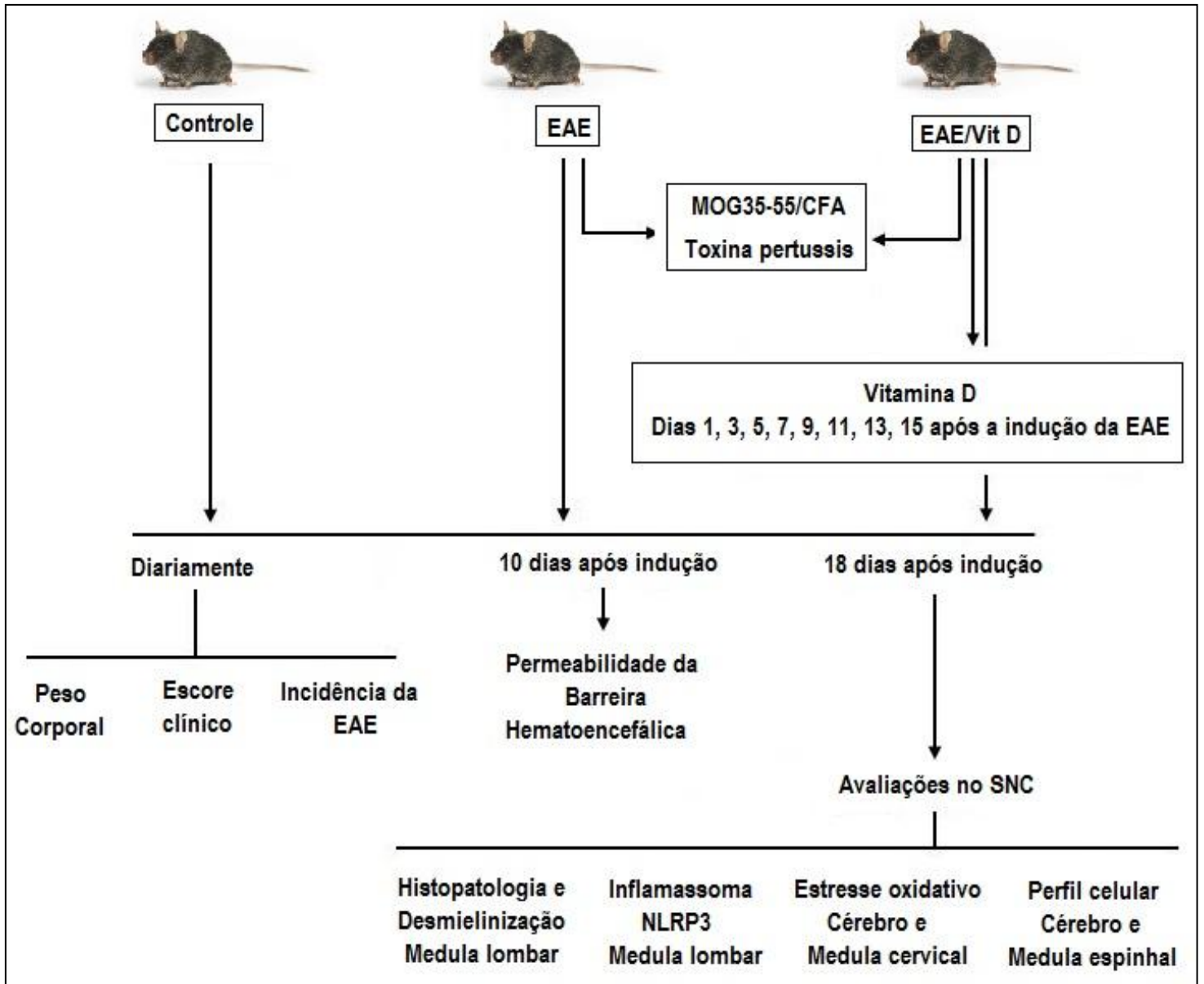
2.1.4. Altera a permeabilidade da barreira hematoencefálica.

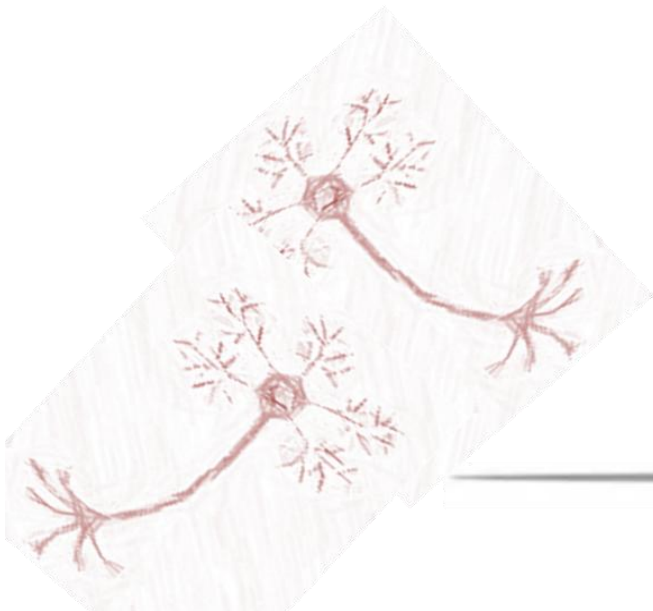
2.1.5. Controla o estresse oxidativo no cérebro e medula cervical.

2.1.6. Altera o nível de expressão gênica do inflamassoma NLRP3 na medula lombar.



3. Protocollo Experimental





4. Material e métodos

4.1. Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6 adquiridas no biotério da USP-Ribeirão Preto com aproximadamente 8 semanas de idade. Os animais receberam ração comercial autoclavada e água filtrada *ad libitum*. Foram mantidos em estantes ventiladas no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNESP de Botucatu, sob condições controladas de luz e temperatura. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) deste instituto (Protocolo número 926).

4.2. Indução de EAE e avaliação clínica

A EAE foi induzida por via subcutânea na base da cauda, com 100 µg de MOG (Genemed) em 50 µL de Adjuvante Completo de Freund (Sigma) contendo *Mycobacterium tuberculosis* (4 mg/mL) cepa H37RA. No dia da imunização e 48 horas depois, os animais foram inoculados com 200 ng de toxina pertussis via intraperitoneal. O peso e sinais clínicos da doença foram avaliados diariamente. A gravidade da doença foi definida segundo a seguinte escala: 0- normal; 1- cauda frouxa; 2- paraparesia moderada, perda da tonicidade do movimento; 3- paralisia parcial dos membros posteriores; 4- paraplegia; 5- tetraplegia ou morte.

4.3. Administração de vitamina D3

Foi administrado 0,1µg de vitamina D3 (1α-,25 dihydroxyvitamin D3 – Sigma) via intraperitoneal em dias alternados durante 15 dias, no total de 8 doses, conforme descrito por Chiuso-Miniccuci *et al.* ⁽¹³⁴⁾. Os animais controle e EAE receberam

doses do veículo utilizado para diluir a vitamina D3.

4.4. Análise histopatológica de inflamação e desmielinização

A medula lombar foi coletada 18 dias após a indução da EAE. Este segmento do SNC foi fixado em formalina a 10% e incluído em Paraplast Plus (McCormick). As amostras foram cortadas com 5 µm de espessura com auxílio de um micrótomo (Leica, RM2245). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e com Luxol Fast Blue (LFB). Foi realizada análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório de acordo com os seguintes critérios: (0) ausência de infiltrado; (1) infiltração parcial na meninge; (2) infiltração mais pronunciada na meninge e (3) infiltração na meninge e no parênquima da medula. ^(135,136)

4.5. Ensaio de permeabilidade da barreira hematoencefálica com NaFLU

O ensaio foi realizado 10 dias após a indução da doença. Inicialmente foram injetados, via intraperitoneal, 100 µl de solução de NaFlu 10% nos animais; após 20 minutos esses animais foram anestesiados e foi realizada a punção cardíaca para obtenção de sangue heparinizado. Os animais foram então perfundidos com salina 0,9% e o cérebro e medula espinhal foram coletados separadamente. Os órgãos foram pesados e macerados com salina 0,9%, em seguida centrifugados, tanto os órgãos quanto o sangue, à 9000 rpm, 22° C por 10 minutos. O sobrenadante e o plasma foram coletados e 100 µl das amostras foram plaqueados em triplicata e analisados em fluorímetro. A incorporação do Naflu no SNC foi calculada pela seguinte equação: (Naflu no SNC/peso do SNC / Naflu no sangue/volume de sangue cardíaco) de acordo com Brown *et al.* ⁽¹³⁷⁾

4.6. Isolamento de células mononucleares do sistema nervoso central

Os animais foram anestesiados com xilazina/quetamina e perfundidos com salina estéril 0,9%. O cérebro e a medula espinhal (porção cervical, torácia e lombar) foram removidos e macerados em meio RPMI (complementado com gentamicina, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de soro bovino fetal (SBF) e 2% de L-glutamina). Em seguida foram adicionados colagenase D (2,5 mg/mL) (Roche) e 10 uL de DNase (100 ug/mL) e as amostras foram incubadas por 45 min a 37°C e 5% CO₂, no escuro. Após a incubação, as amostras foram processadas em *cell strainers* e transferidas para tubos de 15 mL de RPMI. As amostras foram centrifugadas por 7 min a 500G e 18° C. O sobrenadante foi removido e ressuspendido em 7 mL de 1x HBSS, e neste volume foi adicionado 3 mL de Percoll (Sigma) para obtenção do gradiente de SIP 30%. A suspensão de Percoll 30% foi dispensada gentilmente no Percoll 70% para a obtenção de duas fases, e em seguida as amostras foram centrifugadas por 30 min a 900G e 18° C. Foi removida e desprezada a camada superficial de *debris* e coletados 3 mL entre a interface 70%-30%, na qual foram adicionados 7 mL de 1x HBSS e homogeneizado gentilmente. Novamente as amostras foram centrifugadas por 7 min a 500G e 18° C. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de RPMI-10% SBF para ajuste da concentração celular. As amostras foram coradas com líquido de Turk e contadas em câmara de Neubauer.

4.7. Imunofenotipagem

As células mononucleares do SNC, obtidas conforme item 4.7, ajustadas na concentração 1×10^6 células/ml, foram colocadas em tubos Falcon para citômetro

(BD-Becton, Dickinson and Company) e centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD11b conjugado com PerCP-Cy5.5 (eBioscience, San Diego, CA, USA), com anti-CD45 conjugado com FITC (eBioscience), anti-MHCII conjugado com APC (eBioscience), anti-CD40 conjugado com PE (eBioscience) e anti-PD-L1 conjugado com PE-Cy7 (eBioscience) durante 30 minutos em ambiente escuro. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão AutoMacs Running Buffer-Miltenyi Biotec e ressuspendidas no mesmo tampão. As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 1% e adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA) do laboratório de Imunologia de Tumores, Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu. As aquisições foram padronizadas para 100.000 eventos e a análise das células foi realizada no software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EUA).

4.8. Quantificação do estresse oxidativo no SNC

Os parâmetros de estresse oxidativo foram medidos no SNC pelo método descrito por Romualdo *et al.*⁽¹³⁸⁾. Aproximadamente 500 mg de tecido do SNC (cérebro e medula espinhal) foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) com auxílio de homogeneizador. Após centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos a -4°C, o sobrenadante foi utilizado para determinar os parâmetros do estresse oxidativo. A concentração de hidroperóxido de lipídio foi determinada através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe²⁺) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e hidroxitolueno butilato em metanol. Para dosar proteína carbonil, as amostras foram incubadas com 2,4 dinitrophenylhydrazina e centrifugadas na presença de ácido tricloroacético (TCA). Após lavagem com

acetato de etila/etanol (1:1) foi adicionado guanidina a 37°C por 10 minutos. As duas leituras foram realizadas em espectrofotômetro. A concentração de glutathiona total foi determinada através do método cinético, com a redução do 5,5'-Dithio (2 nitrobenzoic acid) (DTNB) pela glutathiona reduzida (GSH) na presença de NADPH. A concentração da glutathiona reduzida e da atividade da glutathiona redutase foram determinadas em tampão tris-HCl pH 8,9 e DTNB, após prévia precipitação com TCA 50%. O GSH foi utilizado como padrão. A atividade da enzima catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). A quantificação da glutathiona peroxidase foi realizada na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura reativa foi preparada em tampão fosfato de sódio, NADPH₂, azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida (GSH) e 12 glutathiona redutase. Através da oxidação do NADPH₂ na presença da glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), foi determinada a atividade da GSH peroxidase. A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela avaliação da capacidade da enzima de inibir a redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O₂⁻ do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando adicionada a amostra, a velocidade de redução do NBT é inibida, de acordo com a atividade de SOD na amostra.

4.9. Expressão gênica do inflamassoma NLRP3 por PCR- tempo real

4.9.1. Extração de RNA

O RNA total foi extraído da medula lombar. As medulas foram colocadas em tubo com 1 ml de Trizol, homogeneizadas e em seguida foram acrescidos 250ul de

clorofórmio na suspensão obtida que foi então homogeneizada em agitador por 10 segundos. Os tubos foram incubados no gelo por 10 minutos e centrifugados por 15 minutos a 12000g 4°C. A fase translúcida obtida (500 ul) foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500ul de álcool isopropílico gelado. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos e incubadas à -20 C por 20 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 15 minutos a 12000g à 4°C para a formação do pellet no fundo do tubo. Todo o líquido foi desprezado sendo, então, adicionado 1ml de etanol 95%. A solução foi centrifugada por 5 minutos, a 12000g à 4°C. Novamente, o líquido foi desprezado. O pellet foi resuspenso em 20ul de água ultrapura.

Após a extração de RNA, as concentrações e a integridade do RNA das amostras foram determinadas a partir dos valores de absorbância, dados pelo aparelho Nanodrop® (Thermo Scientific). A razão $A_{260/280}$ estava entre 1,8 e 2,0, o que indicou a pureza do ácido nucléico. As amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C até o momento de uso.

4.9.2. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 ug de RNA total, pelo Kit High Capacity (*Applied Biosystems*). Para cada 1ug de RNA foram utilizados 2,0 ul de 10x RT Random Primers, 0,8 ul de 25x dNTP Mix (100 mM) 2,0 ul de 10x RT Buffer, 1,0 ul de Multiscribe (Reverse Transcriptase) e 4,2 ul de água DEPC. A solução foi homogeneizada, rapidamente centrifugada e incubada nas seguintes condições da reação: 25°C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos. Foi sintetizada, em uma única vez, a quantidade suficiente de cDNA para a realização

de todo o experimento. As amostras foram mantidas em freezer -80°C , até a utilização na PCR em tempo Real (qPCR).

4.9.3. Quantificação absoluta da expressão gênica (qPCR)

A análise da amplificação dos genes NLRP3, ASC, Caspase 1, IL-1 β e IL-18 foi realizada pelo método da quantificação absoluta. Para isso foi realizada a amplificação gênica, por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema TaqMan, com primers e sondas inventoriadas e testadas pela Life Technologies. O volume total da reação foi de 12,5 μl composto de: 5,0 μl de cDNA, 6,25 μl de TaqMan MasterMix, 0,625 μl de TaqMan Gene Expression Assay (20x) primer/sonda específico e 0,625 μl de H₂O DEPC. As condições da reação foram de 50°C por 2 minutos 95°C por 10 min, seguidos de 45 ciclos de anelamento, a 95°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto, sendo os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60°C por 1 minuto). Paralelamente, foi realizada a amplificação do gene do GAPDH, visto que o valor real de expressão gênica foi realizado através da comparação do resultado da amplificação dos genes de interesses, e desse gene constitutivo. Este controle endógeno permite corrigir variações relacionadas com quantidade de amostra utilizada na extração, eficiência da extração do RNA e da transcrição reversa, amplificação, quantificação, pipetagem e degradação do RNA. Em todos os ensaios as amostras foram processadas em duplicata e cada amostra foi testada pelo programa "Sequence Detection Systems" 1.2.3 – 7300 Real Time PCR Systems- Applied Biosystems, sendo as concentrações calculada pelo $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Os resultados foram expressos em aumento ou diminuição da expressão gênica, em

função da comparação entre os diferentes grupos.

4.10. Análise estatística

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão e as comparações entre os grupos foram realizadas por ANOVA seguida de teste de Tukey. Para as variáveis não paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalos interquartílicos e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. A incidência da doença foi avaliada pelo teste qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%. A diferença entre os escores clínicos foi analisada pelo método da área sob a curva e também pelo *t*-teste. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaPlot for Windows version 12.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).



5. Referências bibliográficas

1. Berge T, Leikfoss IS, Brorson IS, Bos SD, Page CM, Gustavsen MW, et al. The multiple sclerosis susceptibility genes TAGAP and IL2RA are regulated by vitamin D in CD4+ T cells. *Genes and Immunity* 2016; 1–10.
2. Suneetha A, Raja RK. Role of dimethyl fumarate in oxidative stress of multiple sclerosis: A review. *Journal of Chromatography B*. in press.
3. Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 2008; 71: 129–135.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION [internet]. Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008. Geneva: WHO; 2008. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563758_eng.pdf.
5. Pereira ABCNG, Lacativa MCS, Pereira FFCC, Alvarenga RMP. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2015; 572–579.
6. Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 1097–109.
7. Ascherio A, Munger KL, Lünemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 602–12.
8. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 62: 60–5.
9. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006; 296: 2832–8.
10. Dendrou CA, Fugger L. Immunomodulation in multiple sclerosis: promises and pitfalls. *Current Opinion in Immunology*. 2017; 49: 37–43.
11. Milan B. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators of Inflammation* 2013; 2013: 1-11.
12. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707–17.
13. Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol* 2015; 78: 710-21.
14. Colton CA, Gilbert DL. Microglia, an in vivo source of reactive oxygen species in the brain. *Adv Neurol* 1993; 59: 321–6.
15. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annual Review of Immunology* 2005; 23: 683–747.

16. Popescu BFG, Lucchinetti CF: Pathology of demyelinating diseases. *Annual Rev Pathol.* 2012; 7: 185-217.
17. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 2011; 134: 2755-2771.
18. Oberg HH, Juricke M, Kabelitz D, Wesch D. Regulation of T cell activation by TLR ligands. *European Journal of Cell Biology* 2011; 90: 582–592
19. Martí-Orozco E, Norte-Muñoz M, Martínez-García J. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Frontiers in Pediatrics.*, 2017; 5.
20. Calzada D, Baos S, Cremades-Jimeno L, Cárdbaba B. Immunological Mechanisms in Allergic Diseases and Allergen Tolerance: The Role of Treg Cells. *Journal of Immunology Research.* 2018.
21. Damal K, Stoker E, Foley JF. Optimizing therapeutics in the management of patients with multiple sclerosis: a review of drug efficacy, dosing, and mechanisms of action. *Biologics.* 2013; 7: 247–58.
22. Rudick RA. Esclerose Múltipla e patologias desmielinizantes do sistema nervoso central. In: Goldman L, Ausello D, editors. *Tratado de Medicina Interna.* Rio de Janeiro: Elsevier 2005; 2713-21.
23. Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol Scand* 2011; 124: 75-84.
24. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006; 354: 899-910.
25. Aktas O, Küry P, Kieseier B, Hartung HP. Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2010; 6: 373-82.
26. Slowik A, Schmidt T, Beyer C, Amor S, Clarner T, Kipp M. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 is neuroprotective after cuprizone-induced CNS demyelination. *Br J Pharmacol.* 2015; 172: 80-92.
27. Mix E, Meyer-Rienecker H, Hans-Peter H, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis-Potentials and limitations. *Progress in Neurobiology.* 2010; 92: 386–404.
28. Kipp M, van der Star B, Vogel DYS, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 2012; 1: 15–28.
29. Tuohy VK, Lu ZJ, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB. A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol* 1988; 141: 1126–1130.

30. Gold R, Lington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129: 1953-1971.
31. Mimura LAN, Chiuso-Minicucci F, Fraga-Silva TFC, Zorzella-Pezavento SFG, França TGD, Ishikawa LLW, Penitenti AM, Ikomab BMRV, Sartori A. Association of myelin peptide with vitamin d prevents Autoimmune encephalomyelitis development. *Neuroscience* 2016; 317: 130–140.
32. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2015; 14: 406–19.
33. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 1997; 75: 75:77-88.
34. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KHG. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 641-651.
35. Hayes CE. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc. Nutr. Soc.* 2000; 59: 531–535.
36. Freedman DM, Dosemeci M, Alavanja MC. Mortality from multiple sclerosis and exposure to residential and occupational solar radiation: a case–control study based on death certificates. *Occup. Environ. Med* 2000; 57: 418–421.
37. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* 2003; 88: 296–307
38. Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The "sunshine" vitamin. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* 2012; 3: 118-126.
39. Lamberg-Allardt C. Vitamin D in foods and as supplements. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2006; 92: 33–38.
40. Dusso, Brown, Slatopolsky E. Vitamin D. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 2005; 289: F8–28.
41. Zhang J, Habel DM, Ramadass M, Kew RR. Identification of two distinct cell binding sequences in the vitamin D binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1803: 623–629.
42. Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *The Journal of Investigative Dermatology* 1981; 77: 51–58.
43. Dusso, Brown, Slatopolsky E. Vitamin D. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 2005; 289: 8–28.
44. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier

function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 215: 31–38.

45. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 10: 482-596. DOI: 10.1016/j.coph.2010.04.001

46. DeLuca HF, Zierold C. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutr Rev* 1998; 56: S54–S75.

47. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: genomic and nongenomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25: 543–559.

48. Shirvani-Farsani Z, Behmanesh M, Mohammadi SM, Moghadasi AN. Vitamin D levels in multiple sclerosis patients: Association with TGF- β 2, TGF- β RI, and TGF- β RII expression. *Life Sciences* 2015; 134: 63–67.

49. Hart PH, Gorman S, Finlay-Jones JJ. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 584–596.

50. Penna G, Adorini L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* 2000; 164: 2405–2411.

51. Mathieu C. Vitamin D and the Immune system: getting it right. *IBMS BoneKEy.* 2011; 8: 178–186.

52. Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response- The role of glucocorticoids and Vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 120: 86–95.

53. Tian Y, Wang C, Ye Z, Xiao X, Kijlstra A, Yang P. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on Th17 and Th1 response in patients with Behçet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 6434–6441.

54. Chambers ES, Hawrylowicz CM. The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011; 11: 29–36.

55. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2002; 51: 1367–1374.

56. Tang J, Zhou R, Luger D, Zhu W, Silver PB, Grajewski RS, et al. Calcitriol Suppresses Antiretinal Autoimmunity through Inhibitory Effects on the Th17 Effector Response. *J Immunol.* 2009; 182: 4624–4632.

57. Chang JH, Cha HR, Lee DS, Seo KY, Kweon MN. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against

experimental autoimmune encephalomyelitis. PLoS One. 2010; 5: doi: 10.1371/journal.pone.0012925 PMID: 20886077

58. Farias AS, Spagnol GS, Bordeaux-Rego P, Oliveira CO, Fontana AG, de Paula RF, et al. Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Tregs, reducing the severity of EAE. CNS Neurosci Ther. 2013; 19: 269–277.

59. Li B, Baylink DJ, Deb C, Zannetti C, Rajaallah F, Xing W, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses TLR8 expression and TLR8-mediated inflammatory responses in monocytes in vitro and experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. PLoS One. 2013; 8: e58808. doi: 10.1371/journal.pone. 0058808 PMID: 23516559

60. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Exp Immunol. 2010; 162: 1–11.

61. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell 1996; 86:973-83.

62. Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. J Allergy Clin Immunol 2010, 125:985-992.

63. Schattgen SA, Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. Immunol Rev 2011, 243:109-118

64. Moreira LO, Smith AM, Defreitas AA, Qualls JE, El Kasmi KC, Murray PJ. Modulation of adaptive immunity by different adjuvant-antigen combinations in mice lacking *Nod2*. Vaccine 2008, 26: 5808–13.

65. Silva GK, Gutierrez FRS, Guedes PMM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TWP, et al. Cutting edge: Nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol 2010; 184: 1148-52.

66. Yu HB, Finlay BB. The Caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. Cell Host Microbe 2008; 4:198.

67. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature 2006; 442:39.

68. Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Núñez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. J Leukoc Biol 2007; 82: 220–25.

69. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. Nat Immunol 2009; 10(3): 241-47.

70. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *An Ver Immunol* 2009; 27: 229-65.
71. Buzzo L C, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, Cunha LD, Russo M, Zamboni DS, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR. Inflammasomes Synthase Activation through A Novel Pathway for Inducible Nitric-oxide J. *Biol. Chem.* 2010; 285: 32087-32095.
72. de Alba E. Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *J Biol Chem* 2009; 284: 32932–41.
73. Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C. Activation of inflammasomes requires intracelular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *J Immunol* 2009; 182: 3173-82.
74. Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 2010; 8: 471–83.
75. Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 213–220.
76. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* 2008; 132: 818–31.
77. Vieira SM, Cunha TM, França RFO, Pinto LG, Talbot J, Turato WM, Lemos HP, Lima JB, Verri Jr. WA, Almeida SCL, Ferreira SH, Louzada-Junior P, Zamboni DS, Cunha FQ. Joint NOD2/RIPK2 Signaling Regulates IL-17 Axis and Contributes to the Development of Experimental Arthritis. *J Immunol* 2012; 188: 5116-5122.
78. Joosten LA, Heinhuis B, Abdollahi-Roodsaz S, Ferwerda G, Lebourhis L, Philpott DJ, Nahori MA, Popa C, Morre SA, van der Meer JW, et al. Differential function of the NACHT-LRR (NLR) members Nod1 and Nod2 in arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008; 105: 9017–9022.
79. Ospelt C, Brentano F, Ju“ngel A, Rengel Y, Kolling C, Michel BA, Gay RE, Gay S. Expression, regulation, and signaling of the patternrecognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain 2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 355–363.
80. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K et al. Cryopyrin activates the infammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006; 440: 228–232.
81. Gross O, Poeck H, Bscheider M et al. Syk kinase signaling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 2009; 459: 433–436.
82. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237–241.
83. Halle A, Hornung V, Petzold GC et al. The NALP3 inflammasome is involved in

the innate immune response to amyloid- $\beta\beta$. *Nature Immunology* 2008; 9: 857–865.

84. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10: 210–215.

85. Dostert C, Pétrilli V, van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008; 320: 674–677.

86. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology* 2008; 9: 847–856.

87. Perregaux D, Gabel CA. Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 15195–15203.

88. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation*. 2007; 14: 1583–1589.

89. Kanneganti TD, Lamkan M, Kim YG et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of toll-like receptor signaling. *Immunity* 2007; 26: 433–443.

90. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011; 469: 221–225.

91. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology* 2011; 12: 222–230.

92. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *European Journal of Immunology* 2010; 40: 616–619.

93. Inoue M, Shinohara ML. NLRP3 Inflammasome and MS/EAE. *Autoimmune Diseases* 2013; 2013: 1-8.

94. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 423-74.

95. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006; 203: 1685-91

96. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 2009; 30: 576-87.

97. Ming X, Li W, Maeda Y, Blumberg B, Raval S, Cook SD et al. Caspase-1 expression in multiple sclerosis plaques and cultured glial cells. *J Neurol Sci.* 2002; 197: 9–18.
98. Huang WX, Huang P, Hillert J. Increased expression of capase-1 and interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2004; 10: 482–487.
99. Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol.* 2010; 185: 974-81.
100. Inoue M, Williams KL, Gunn MD, Shinohara ML. NLRP3 inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109: 10480–10485.
101. Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ et al. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *Journal of Neuroscience* 2010; 30: 15811-15820.
102. Furlan R, Martino G, Galbiati F et al. Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination. *Journal of Immunology* 1999; 163: 2403-2409.
103. Ahmed Z, Doward AI, Pryce G et al. A role for caspase-1 and -3 in the pathology of experimental allergic encephalomyelitis: inflammation versus degeneration. *American Journal of Pathology* 2002; 161: 1577–1586.
104. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, de Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr.* 2010; 23: 629-643.
105. Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr.* 2003; 16: 433-41.
106. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004; 53: 110-8.
107. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB.* 1997; 43: 61-8.
108. Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RBME.* 2004; 10: 308-13.
109. Bernard K, Krause KH. The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87: 245-313.
110. Welch KD, Davis TZ, Eden MEV, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 577-83.

111. Fischer MT, Sharma R, Lim JL et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 2012; 135: 886.
112. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab* 2009; 20: 332.
113. Surace M, Block M. Targeting microglia-mediated neurotoxicity: the potential of NOX2 inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci* 2012; 69: 2409.
114. Leto TL, Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid. Redox Signal* 2006; 8: 1549.
115. Honorat JA, Kinoshita M, Okuno T et al. Xanthine oxidase mediates axonal and myelin loss in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One* 2013; 8: 713.
116. Ortiz GG, Pacheco-Moises FP, Bitzer-Quintero OK et al. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clin. Dev. Immunol.* 2013; 1-14.
117. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142: 231-55.
118. Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr.* 2004; 17: 227-36.
119. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.* 1999; 12: 123-30.
120. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72: 637-46.
121. Prasad AS, Beck FWJ, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85: 837-44.
122. Huynh JL, Casaccia P. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment. *Lancet Neurol.* 2013; 12: 195.
123. Acar A, Ugur CM, Evliyaoglu O et al. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Belg.* 2012; 112: 275.
124. Ghabaee M, Jabedari B, Al-E-Shagh N, Ghaffarpour M, Asadi F. Serum and cerebrospinal fluid antioxidant activity and lipid peroxidation in Guillain Barre syndrome and multiple sclerosis patients. *Int. J. Neurosci.* 2010; 120: 301.
125. Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J. Neurol. Sci.* 2008; 274: 48.

126. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem.Res. Toxicol.* 2008; 21: 172.
127. Besler HT, Comoglu S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutr.Neurosci.* 2003; 6: 189.
128. Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Majsterek I. The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurochem. Res.* 2011; 36: 1012.
129. Marintim AC, Sander RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17: 24-38.
130. Imaizumi S, Kondo T, Deli MA, Gobbel G, Joo F, Epstein CJ, et al. The influence of oxygen free radicals on the permeability of the monolayer of cultured brain endothelial cells. *Neurochem Int.* 1996; 29: 205–11.
131. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2011; 134: 1914–24.
132. Ruuls SR, Bauer J, Sontrop K, Huitinga I, t Hart BA, Dijkstra CD. Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 1995; 56: 207–17.
133. Othman SA, Yabe T. Use of hydrogen peroxide and peroxy radicals to induce oxidative stress in neuronal cells. *Reviews in Agricultural Science.* 2015; 3: 40-45
134. Chiuso-Minicucci F, Ishikawa LL, Mimura LA, Fraga-Silva TF, França TG, Zorzella- Pezavento SF, et al. Treatment with vitamin D/MOG association suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* 2015; 12:e0125836.
135. Soellner IA, Rabe J, Mauri V, Kaufmann J, Addicks K, Kuerten S. Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.* 2013; 149: 519-29.
136. Kluver, H., and Barrera. A method for the combined staining of cells and fibers in the Nervous system. *J. Nueropath. Exp. Neurol.* 1953; 12: 400-403
137. Walker-Caulfield ME , Hatfield JK, Brown MA. Dynamic changes in meningeal inflammation correspond to clinical exacerbations in a murine model of relapsing–remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology.* 2015; 278: 112–122.
138. Romualdo, R. *et al.* An integrative analysis of chemically-induced cirrhosis-associated hepatocarcinogenesis: Histological, biochemical and molecular features. *Toxicology Letters.* 2017; 281: 84–94.

Capítulo 2



6. Artigo

6.1. Artigo: Submetido para a revista *Scientific Reports*

Early intervention with vitamin D3 prevented neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis

Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira^{1,*}, Luiza Ayumi Nishiyama Mimura¹, Thais Fernanda de Campos Fraga-Silva¹, Larissa Lumi Watanabe Ishikawa¹, Ana Angélica Henrique Fernandes², Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento¹ and Alexandrina Sartori¹

1. Institute of Biosciences, Department of Microbiology and Immunology, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, 18618-000, Brazil.

2. Institute of Biosciences, Department of Chemistry and Biochemistry, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, 18618-000, Brazil.

*Correspondence author: larissa.ragozo@unesp.br

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a progressive disease of the central nervous system (CNS) involves damage to the myelin sheath surrounding axons. Its therapy is based on immunomodulatory drugs that reduce disease recurrence and severity. Vitamin D (Vit D3) is a hormone whose immunomodulatory ability over both, innate and specific immunity, has been widely demonstrated, including in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. In this study we evaluated the potential of Vit D3 to control neuroinflammation during EAE development. C57BL/6 mice were immunized with MOG and treated with Vit D3. This treatment decreased incidence, clinical score and the demyelination process. It also locally decreased the MHCII expression in macrophages and microglia and controlled the oxidative stress. In addition, Vit D3 reduced the mRNA expression for NLRP3, caspase-1 and IL-1 β indicating low inflammasome activation. All these effects were preceded by stabilization of the blood spinal cord barrier permeability. These results indicate that an early intervention with Vit D3 is able to control the neuroinflammatory process that characterizes EAE immunopathogenesis and could, therefore, be explored as an adjunct therapy for MS patients.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS) whose acute or recurrent episodes lead to a gradual and progressive neurologic deterioration¹. An estimated 2 million people worldwide are suffering from MS; they are more commonly aged 20 to 40 years, that is, among the most economically active population, being the disease more common in woman than men². Evidences indicate that MS is an autoimmune pathology mainly mediated by myelin-specific Th1 and Th17 cells. After an initial activation at the peripheral lymphoid organs, these lymphocytes can cross the blood-brain barrier (BBB) by interacting with adhesion molecules and chemokine receptors. Once in the CNS these lymphocytes are reactivated by dendritic cells (DC), macrophages infiltrating or microglia and release cytokines such as IFN- γ and IL-17 that, together with many other mediators, trigger a persistent inflammation associated to inflammasome activation, mainly the NLRP3, and oxidative stress³. Reactive oxygen species (ROS), if produced in excess lead to oxidative stress and have been implicated on demyelination and axonal damage in both MS and its animal models⁴.

The major contribution of inflammasome activation to MS seems to come from the IL-18/ IL-1 β /Th1/Th17 axis. Cytokines synthesized after activation of this platform, such as IL-1 β and IL-18, contribute to differentiation and maintenance of Th1 and Th17 cells, the main cellular subpopulations responsible for the pathogenesis of the disease⁵⁻⁷. IL-18 promotes the differentiation of Th1 cells by directly activating activator protein 1 (AP-1)⁸, triggering strong IFN- γ production, whereas the IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of forkhead box P3 (FOXP3)⁹. In addition, IL-1 β is associated with impairment of the BBB, favoring the migration of these cells to the CNS¹⁰.

Many aspects seem to contribute to the autoimmune dysregulation that occurs in MS, including genetic and environmental factors. Numerous epidemiological studies have strongly correlated sunshine and vitamin D (Vit D3) blood levels with MS prevalence, mainly in temperate countries, that records lower sun exposure during the winter, interfering in Vit D3 synthesis in the skin¹¹⁻¹⁵.

Despite the variety of drugs available for MS therapy they are not able to cure or to prevent disease development. Most of the studies aiming to disclose MS immunopathogenesis and new prophylactic or therapeutic strategies are initially carried out using experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) that is an MS animal model^{16,17}. Numerous studies highly suggest that Vit D3 is efficient to control EAE development¹⁸⁻²⁰. Although Vit D3 can

bind to both genomic and non-genomic targets, the most important immunomodulatory properties are elicited by genomic mechanisms²¹.

The ability of Vit D3 to control MS and EAE seems to come from its immunomodulatory effect and direct activities over the CNS. These effects are mediated by the presence of VDR and 1α -hidroxilase, that catalyzes the production of active Vit D3, in macrophages, DC, T and B activated lymphocytes, BBB endothelial cells, microglia and neurons. Vit D3 is well-recognized as a neurosteroid that modulates multiple brain functions. A growing body of evidence indicates that Vit D3 plays a pivotal role in brain development, neurotransmission and neuroprotection²². In different neurotoxicity models in rats, Vit D3 administration promoted neuron survival by regulating calcium levels or by decreasing free radical production. Besides, in vitro studies using rat neuron cultures showed that active Vit D3 increases glutathione levels in these cells. The reduced form of glutathione (GSH), supplied to nerve cells by astrocytes, is a key antioxidant that protects cells against ROS and apoptosis^{23,24}.

The complex regulatory role of this vitamin in both innate and specific immunity is well established. It clearly increases microbicidal activities of monocytes and macrophages²⁵ whereas it usually down-modulates the expression of CD1a, MHC II, CD40, CD80 and CD86 in DC and other antigen presenting cells²⁶. Cytokine production is also modulated by Vit D3; it inhibits, for example, IL-12 and IL-23 whose production is fundamental for Th1 and Th17 differentiation, respectively²⁶. The reduced IL-2 and increased IL-10 production were associated with tolerogenic phenotype in DC²⁷. The contribution of tolerogenic DC to control EAE development was clearly demonstrated by Farias *et al.*¹⁶. These authors showed that adoptive transference of immature DC obtained by in vitro treatment of bone marrow derived DC with Vit D3, were able to reduce disease severity in rat EAE. The addition of Vit D3 during differentiation of DC in vitro resulted in reduced T cells proliferation and lower IFN- γ production²⁸, favoring the development of regulatory T cells (Tregs cells) that are characterized mainly by the expression of CD4, and CD25 and Foxp3⁺ molecules and the production of anti-inflammatory cytokines²⁹. Previous findings from our group also showed that vitamin D3 has protective effect when given alone or in combination with MOG which was the specific autoantigen^{30,31}. In this context we investigated if a precocious intervention with Vit D3 would be able to block neuroinflammation in a MS experimental model

Results

Vitamin D controls clinical and histopathological EAE development. C57BL/6 mice submitted to EAE induction were treated that begun 1 day after disease induction, with 8 doses, in alternate days, with Vit D3 by ip route. Vit D3 treatment, significantly reduced EAE incidence as illustrated in table 1. As can be observed, disease incidence was reduced to 23,8% in the treated group whereas the non-treated one presented 95,2% incidence. Treatment delayed disease appearance (Fig 1a), determined much lower clinical scores (figure 1b) and also reduced the maximum clinical score (figure 1c). As expected, sick animals in both groups lost weight, however Vit D3 determined weight loss early after its administration, as showed in figure 1d.

These findings were reinforced by histopathological analysis. As expected, a very accentuated cellular infiltration (figure 2b) associated with a clear demyelinating process (figure 2e) was observed at the spinal cord sections in non-treated animals compared to the ones that received Vit D3 (figure 2c,f). The striking reduction of the inflammatory infiltration is illustrated in figure 2g.

Groups	Incidence	P value
EAE	95,2 % (20/21)	p<0,001
EAE/Vit D3	23,8 % (05/21)	

Table 1: Incidence of EAE, Chi-square test (21 animals / group) combined results from 4 independent experiments.

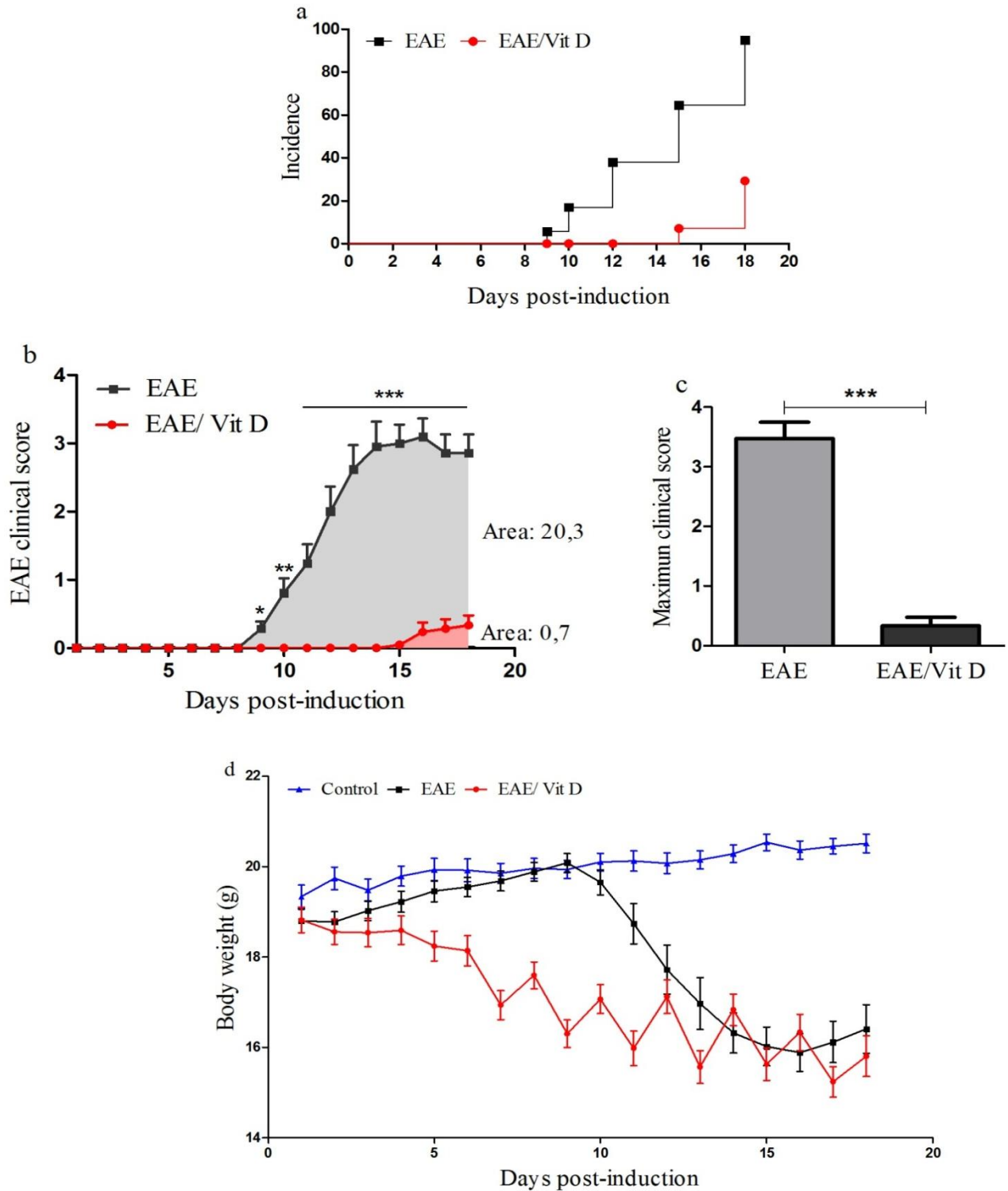


Figure 1

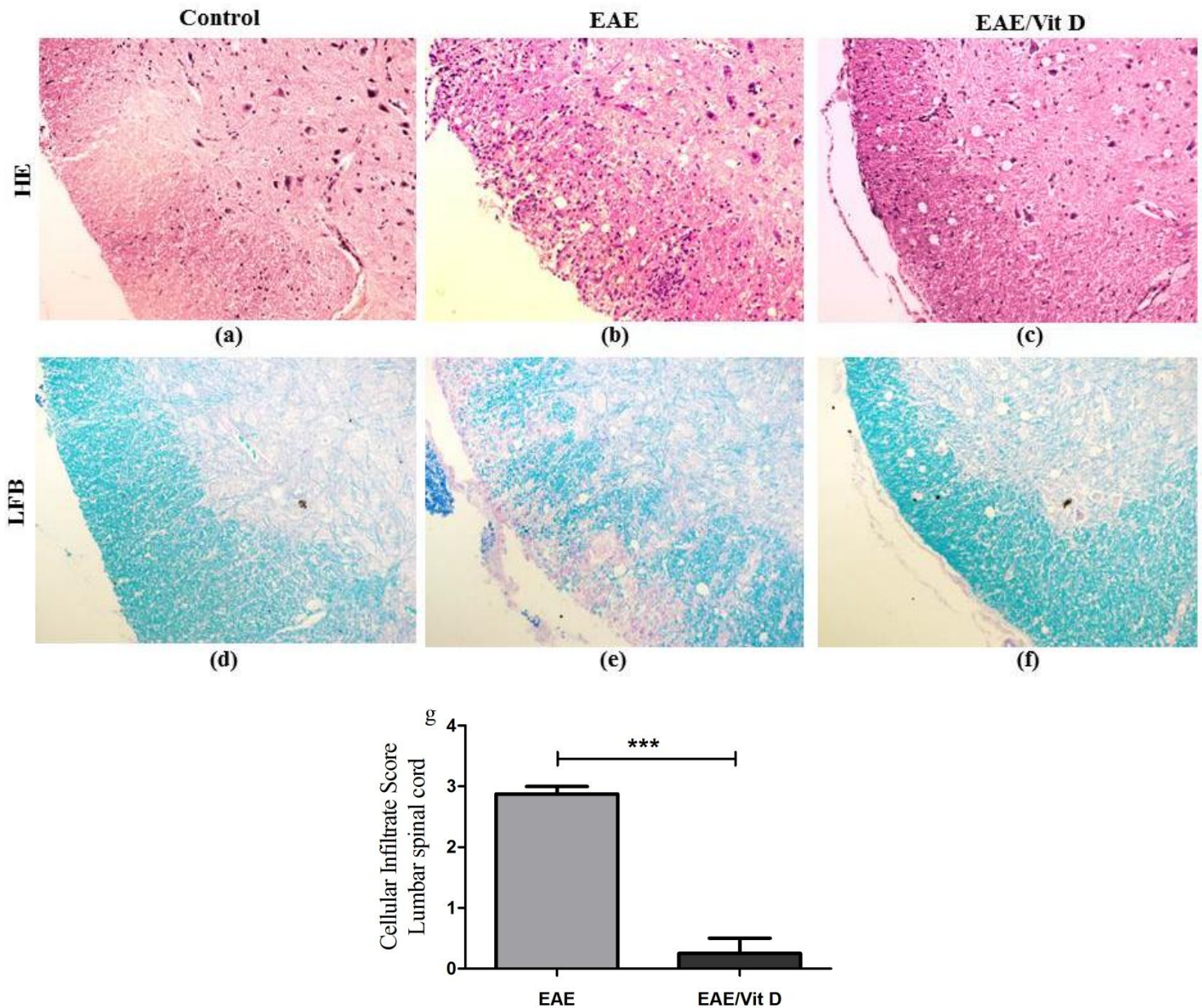


Figure 2

Vit D3 normalizes the blood-spinal cord barrier permeability. The stabilizing effect of Vit D3 was already demonstrated in a model of hypoxia/reoxygenation³². To investigate if the reduced neuroinflammation process was correlated with the maintenance of the BBB permeability, we evaluated the blood-brain and blood-spinal cord permeability. As expected, barrier permeability was augmented in these two sites in EAE mice being the spinal cord one significantly altered. Vit D3 administration brought permeability to normal levels, mainly at the spinal cord as showed in figure 3a.

In line with this result, a much lower absolute number of cells was eluted from the CNS of treated mice, even though this number was still higher than the amount of cells found

in the CNS of normal mice (figure 3b).

To define if this reduction involved certain cell subsets, cells were eluted from the CNS and analyzed. To differentiate lymphocytes ($CD45^{\text{high}}CD11b^{-}$) from infiltrating macrophages and activated microglia ($CD45^{\text{high}}CD11b^{+}$) from resting microglia ($CD45^{\text{low}}CD11b^{+}$) we employed the phenotypic markers suggested by Murphy *et al.*³³ Vit D3 treatment significantly reduced the number of lymphocytes in comparison to non-treated mice (figure 3c). Vit D3 also determined a slight reduction of macrophages and activated microglia (figure 3d). As expected the amount of resting microglia was reduced in EAE group in comparison to the control (normal) group (figure 3e).

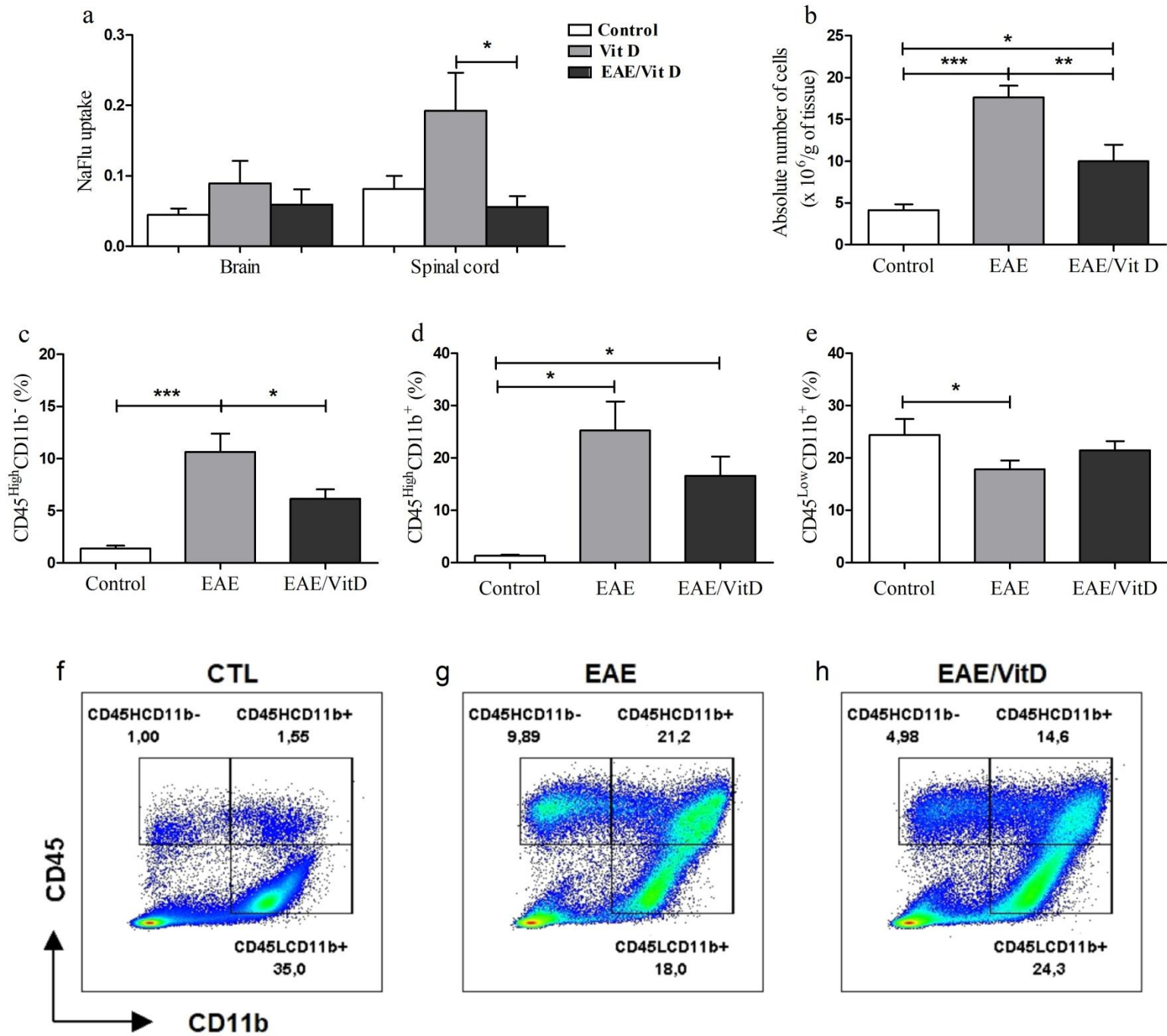


Figure 3

MHC II expression is targeted by Vit D3 treatment. As described before, lymphocyte population was affected by Vit D3 treatment. As the activity of these cells is partially mediated by their effects on the innate cells, in this case macrophages and microglia cells, we characterized their activation status by determining the expression of activation markers. Vit D3 therapy significantly down-modulated MHC II expression (figure 4 a,e) and did not affect

the expression of PD-L1 (figure 4 b,f) and CD40 (figure 4 c,g) in both, infiltrate macrophages/activated microglia and resting microglia.

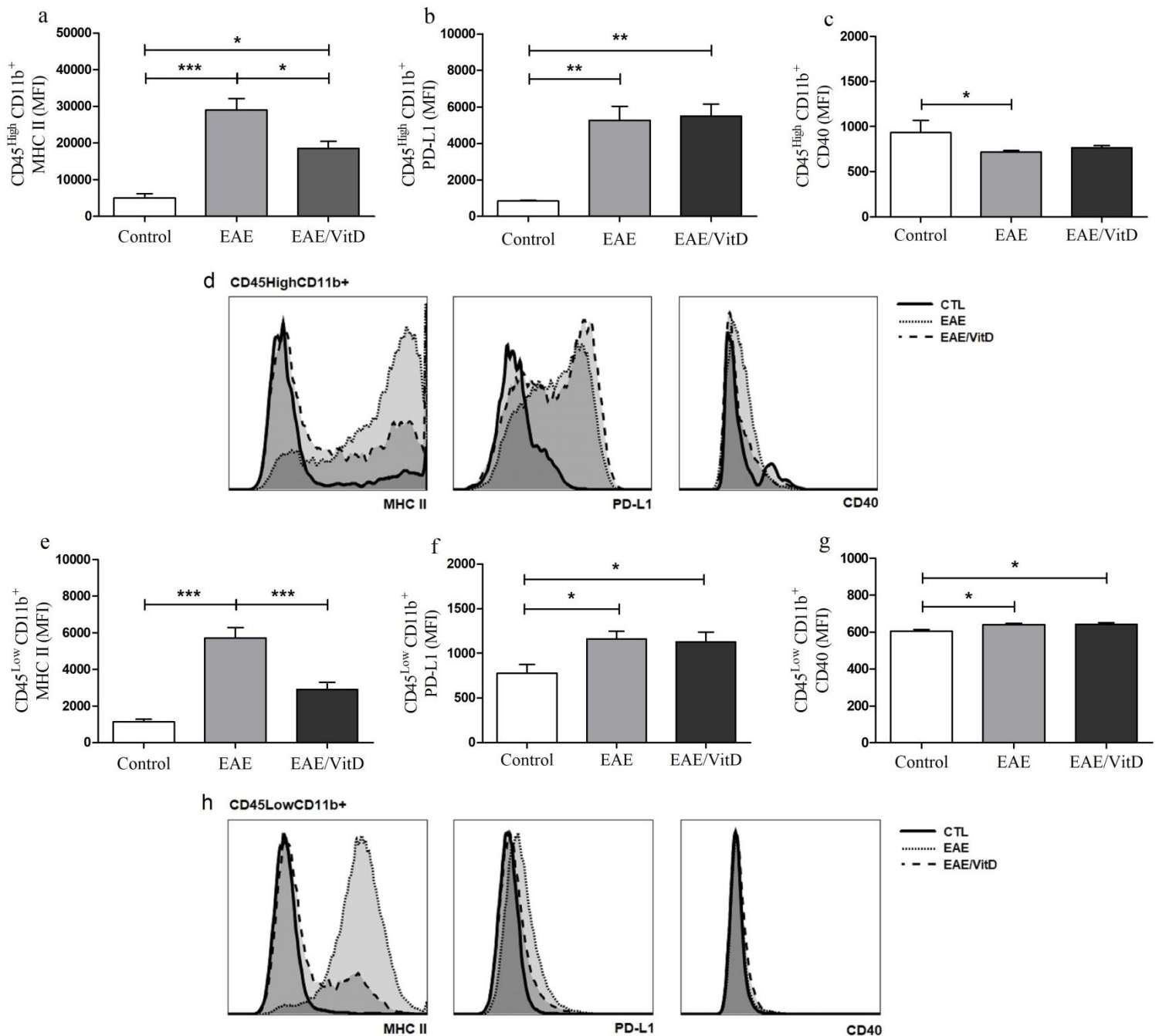


Figure 4

Expression of inflammasome associated genes is down-modulated by Vit D3 treatment.

There is a considerable amount of evidence in patients with MS that inflammasome activation occurs during disease. Experiments with EAE specifically describe the NLRP3 inflammasome as critical and necessary to disease development³⁴. For that reason we evaluated the genetic

expression of genes encoding the principal components of NLRP3 activation: mNLRP3, mASC, mcaspase 1, mIL-1 β and mIL-18. These determinations were done in lumbar spinal cord samples. As demonstrated in Figures 5a, c, and e, treatment with Vit D3 was associated with a significant reduction in the mRNA expression of NLRP3, caspase 1 and IL-1 β respectively. No changes were observed in the mRNA levels for ASC and IL-18 (Figures 5b and d) respectively.

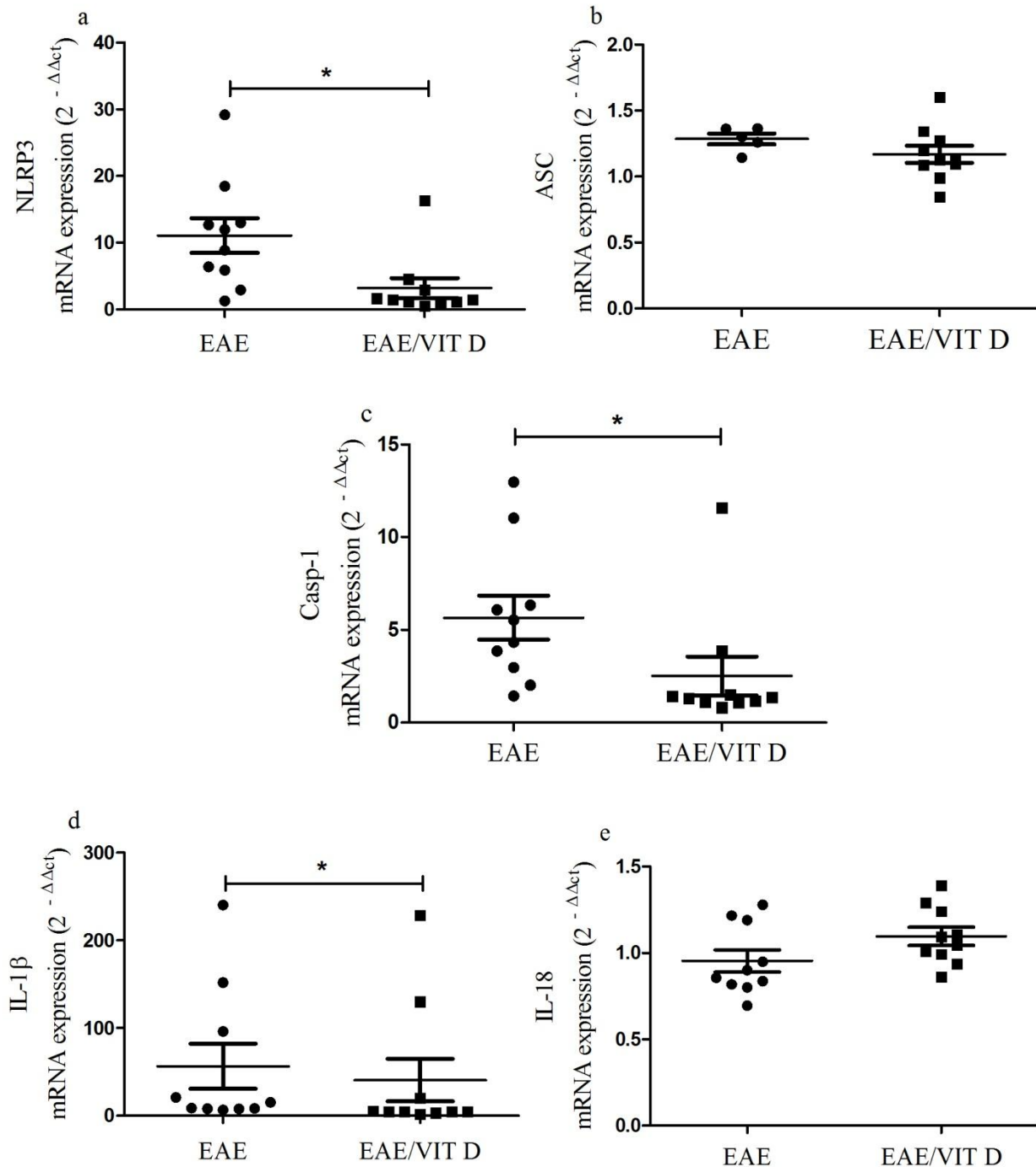


Figure 5

Vitamin D3 controls oxidative stress in EAE. The CNS is highly susceptible to the effect of free radicals because it requires a lot of oxygen to function and also has a low supply of antioxidants. Accumulating data indicates that the oxidative stress plays a substantial role in the pathogenesis of both, MS and EAE^{35,36}. In this investigation we evaluated if the status of the CNS oxidative stress associated with EAE development could be blocked by early Vit D3 administration. The following parameters were analyzed: the end products (lipid hydroxide

and protein carbonyl) and the antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) associated with oxidative stress.

As displayed in figures 6a and b, the development of this pathology was characterized by a conspicuous elevation in the levels of lipid hydroxide and protein carbonyl, indicating the establishment of an accentuated oxidative stress condition. A concomitant and clear reduction in the levels of enzymes able to control this oxidative stress as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase as showed in figures 6a, b and c, respectively was also observed. At these same illustrations it can be observed that Vit D3 treatment was able to significantly reverse these alterations.

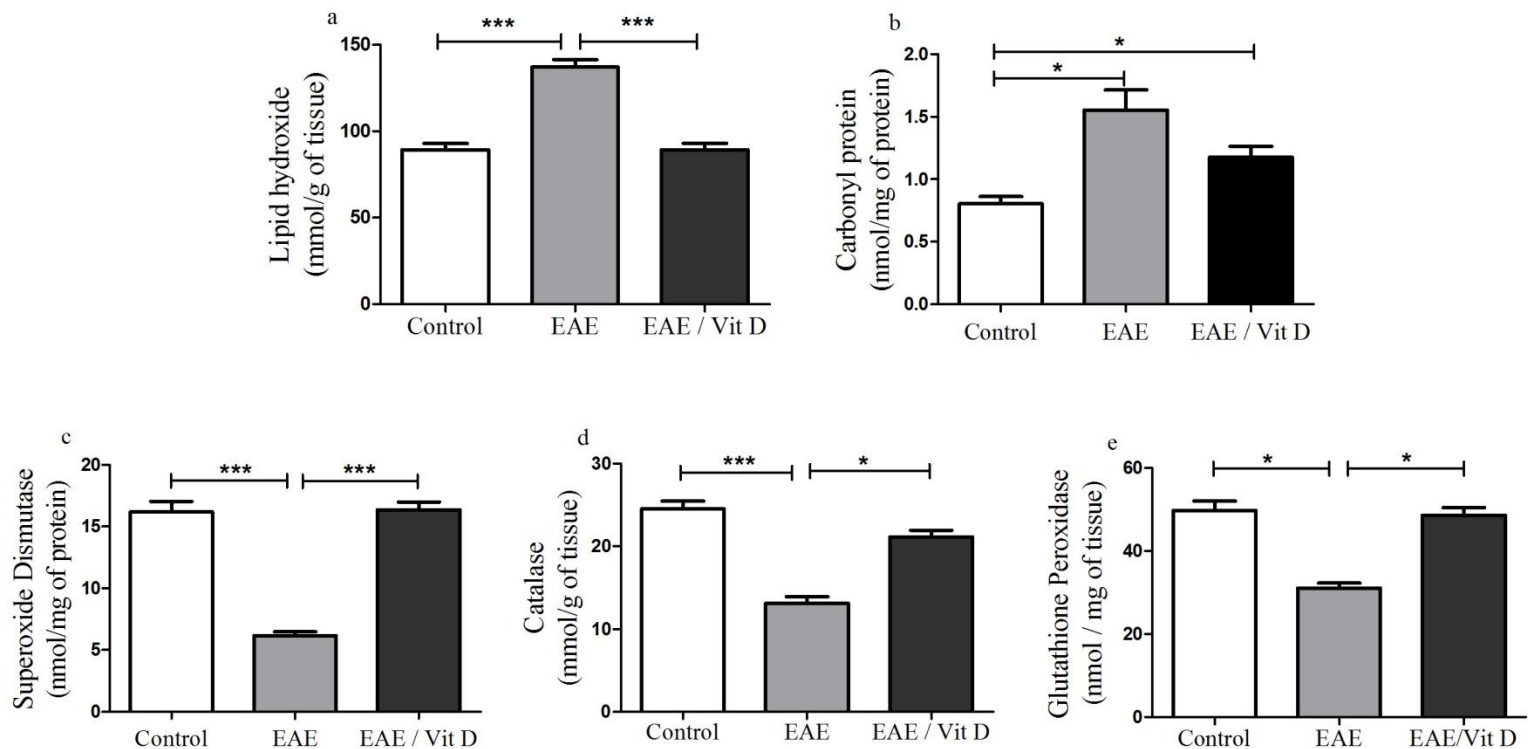


Figure 6

Discussion

The potential use of vitamin D3 as a preventive or therapeutic measure for MS is mostly based on its well-known ability to modulate the immune system, specially concerning the specific immunity. In spite of its complex and still controversial etiology, it is well established that an autoimmune response specific for neuroantigens is present in these patients³⁷. MS treatment is also mostly based on the adoption of immunomodulatory drugs³⁸.

In this work, we used an experimental mouse model (experimental autoimmune

encephalomyelitis - EAE) of MS to investigate the ability of active vitamin D (Vit D3) to control the disease at the CNS level. We therefore treated C57BL/6 mice subjected to EAE induction with eight Vit D3 doses in alternate days, being the first dose delivered 24 hours after disease induction. We understand this experimental procedure as resembling individuals that are prone to develop the disease but whose autoimmune response was not effectively mounted yet. Initial results indicated that Vit D3 was able to control the disease in various aspects including incidence, clinical score and elapsed time between disease induction and clinical manifestations. CNS analysis clearly indicated that inflammation and demyelination processes, that are considered hallmarks of this pathology³⁹, were mostly controlled by Vit D3 early supplementation. Vit D3 efficacy was partial, that is, there was a residual local inflammation that allowed to compare of these cells with the ones eluted from non-treated mice. Disease control was concomitant with reduced lymphocyte infiltration in the CNS and also a lower MHCII expression in both, infiltrating macrophages and microglia cells.

It is well established that inflammation and oxidative stress, which mutually amplify each other, play a major role in the pathogenesis of MS and EAE⁴. Vit D3 treatment brought the oxidative stress markers, found altered in EAE mice, back to physiological levels. It normalized both, the elevated end products associated with oxidative stress (lipid hydroxide and protein carbonyl) and the lowered antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase).

This effect was essentially attributed to the smaller amount of T cells that reached the CNS considering that a reduced interaction with innate cells would trigger a lower oxidative stress level. Two of the most studied innate cell populations involved in ROS-mediated tissue damage in MS are infiltrating macrophages and resident microglia cells⁴⁰. These two cell types expressed much lower levels of MHCII in Vit D3 treated mice, suggesting that they were less activated as is described by other authors^{41,42}. The possibility that Vit D3 is reaching and therefore acting directly at the CNS cells needs also to be considered. This hypothesis is sustained by literature that indicates that Vit D3, Vit D3 binding protein, VDR and enzymes involved in its metabolism are all found in different brain cells⁴³. This hormone is also a neuroactive substance that plays a major role on CNS development and on its numerous functions^{44,45}.

Evidences obtained so far already allow to attribute an essential contribution of inflammasome to MS and EAE development. This complex and powerfull signaling platform promotes T cell pathogenicity, infiltration of cells into the CNS and also neurodegeneration³⁴. Our results indicated that Vit D3 was capable to significantly control the local mRNA

expression of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β , suggesting therefore, that the early intervention with this substance blocks this pivotal and amplifying pro-inflammatory platform. The essential contribution of this system to MS and EAE immunopathogenesis has been experimentally proven. It has been showed, for example, that activated inflammasome components are present in MS lesions⁴⁶ and that genetic knockout of inflammasome factors can block EAE development⁴⁷. Considering MS and EAE complexity we could speculate that this effect over inflammasome activation is occurring at different disease stages. It could happen very early in the periphery by interfering with Th polarization. Vit D3 could decrease Th1 and Th17 differentiation that are involved in two critical disease steps: entry in the CNS and ensuing neurodestruction⁴⁸. Alternatively, Vit D3 could decrease the local inflammatory status by avoiding cell infiltration and, therefore, the degree of local inflammasome activation.

The barrier permeability test together with the analysis of the CNS infiltrating cells indicated that a significant part of Vit D3 effect is being mediated by its stabilizing activity over the blood-brain barrier (BBB). The BBB stabilization was already described in other experimental disease models³². More recently, Takahashi *et al.*⁴⁹, by using human endothelial cells, observed that these cells express VDR and that their contact with VitD decreases permeability by reducing vascular cell adhesion molecule-1 expression and by restoring the zonula occludens-1 and claudin-5.

Altogether our results indicate that an early and constant supply of Vit D3 can control neuroinflammation in EAE. The results also suggest that this effect is mostly mediated by BBB stabilization, avoiding therefore cell infiltration in the CNS and the subsequent triggering of oxidative stress and inflammasome activation.

Methods

Experimental design

C57BL/6 female mice were allocated into three experimental groups: negative control (normal animals); EAE (animals immunized with MOG to develop encephalomyelitis) and EAE/Vit D (immunized with MOG and treated with vitamin D3). Body weight and clinical scores were daily evaluated and the tests concerning blood-brain and blood-spinal barriers were done at the 10th day after disease induction. The other assays (histopathological analysis, immunophenotyping of cells, oxidative stress status and inflammasome activation) were carried at the EAE acute phase, that is, 18 days after disease induction.

Animals

Female C57BL/6 mice (8 to 9 weeks old) were bought from the animal facility of the Medical School – University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil. Water and food were both sterilized and offered on an *ad-libitum* basis. Animals were housed in ventilated cages (Alesco[®], Monte Mor, SP, Brazil) in pathogen-free conditions and handled according to the ethical procedures established by the National Council for the Central of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil). The whole procedure was analyzed and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Institute of Biosciences, Unesp, Botucatu (CEUA-Process 926).

EAE induction, vitamin D administration and disease evaluation

Nine-weeks old female C57BL/6 mice were subcutaneously immunized, at the caudal basis, with 100 µg of MOG₃₅₋₅₅ (Genemed Synthesis Inc., MO, USA) emulsified with CFA containing 4 mg/mL of *Mycobacterium tuberculosis* (Difco, Detroit, MI, USA). Mice also received two intraperitoneal doses of *Bordetella pertussis* toxin (Sigma Aldrich), 200 ng each; one at the immunization day and the other 48 h after disease induction. Body weight and disease score were daily evaluated. Disease clinical scores were defined according to the following manifestations: no symptoms (0); limp tail (1); hind legs weakness (2); partially paralyzed hind legs (3); complete hind legs paralysis (4) and complete paralysis (5). Mice were treated with 8 doses (0,1 µg each) of vitamin D3 (1 α ,25 dihydroxyvitamin D3 – Sigma), delivered by intraperitoneal route and in alternative days as previously described³⁰. Treatment was initiated 24 hours after immunization.

Inflammation and demyelination

Histopathological evaluations were done 18 days after disease induction. Lumbar spinal cord segments were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated in graded ethanol and then included in Paraplast Plus (McCormick, St. Louis, MO, USA). Five µm-thick sections were obtained with a Leica RM2245 microtome and stained with with hematoxylin and eosin (HE) or with luxol fast blue (LFB) to analyze the intensity of inflammation and demyelination, respectively. The intensity of the inflammatory infiltration was defined according to the criteria already used by other authors^{50,51}: absence of inflammatory infiltrate (0); focal meningeal infiltrates (1); more pronounced meningeal infiltrates (2) and pronounced meningeal and some parenchymal infiltration (3).

Blood-CNS barrier permeability assays

This evaluation was performed 10 days after disease induction and was based on the Naflu protocol described by Brown *et al.*⁵². Briefly, mice were injected by intraperitoneal route with 100 µl of a 10% solution of sodium fluorescein (Naflu) (Sigma –Aldrich) and 20 minutes later they were anesthetized and blood withdrawal for further plasma separation. The animals were then perfused with 10 ml of 0,9% saline solution and the brains and spinal cord were collected and individually processed. After being weighed these organs were macerated with 400 µl of saline solution and then centrifuged (9000 rpm, 22° C for 10 min). These homogenates and the plasma samples were distributed in 96-well black plate and read in a Synergy 4 fluorimeter (Biotek instruments). Naflu uptake by brain and spinal cord were calculated according to the following equation: (tissue sample RFU/tissue sample weight)/ (plasma RFU/amount of cardiac blood). RFU: relative units of fluorescence.

CNS cells isolation and immunophenotyping

Brain and spinal cord were collected after animal's anesthesia and perfusion. Both organs were initially macerated and further incubated in RPMI medium (Sigma-Aldrich) containing 2,5 mg/ml of collagenase D (Roche Applied 220 Science, Indianapolis, IN, USA) and 100 µg/ml of DNase (Sigma-Aldrich). After incubation (45 min/37°C/CO₂ 5%) the material was further processed through cell strainers (70 µm) and the cells washed with RPMI and resuspended in a 30% percoll solution (GE, Healthcare, Uppsala, SWE). This cell suspension was gently dispensed over 70% percoll and centrifuged at 950 g during 20 min. Cells were then washed, resuspended (1x10⁶ cells/ml) and incubated with the following fluorochrome-labeled monoclonal antibodies (eBioscience, San Diego, CA, USA): 0.2 µg anti-CD11b-PerCP-Cy5.5 (M1/70), 0.5 µg anti-CD45-FITC (30- F11), 0.03 µg anti-MHCII-APC (MS/114.15.2), 0.15 µg anti-CD40-PE (1C10) and 0.1 µg anti-PD-L1-PE-Cy7 (MIH5) during 30 min and 4°C at dark. Cells were then washed and resuspended with Auto Macs Running Buffer-Miltenyi. Labeled cells were then fixed in paraformaldehyde 1% and acquired by using the FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and analyzed with FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, EUA).

Oxidative stress analysis

Oxidative and anti-oxidative parameters were measured at the CNS by the biochemical methodology already described by Romualdo *et al.*⁵³. Approximately 500 mg of CNS (brain plus spinal cord) were mechanically homogenized in sodium phosphate buffer (0,1 M/pH

7.0). This material was centrifuged (1200g/15min) and supernatants used for biochemical assays. Lipid hydroperoxide levels were assessed by Fe_2^+ oxidation reaction in the presence of xylenol orange, sulfuric acid and butylated hydroxytoluene diluted in methanol. To evaluate the degree of protein carbonylation the samples were incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine and centrifuged in the presence of trichloroacetic acid. The protein pellet was washed with a mixture of ethanol:ethyl acetate and then resuspended in guanidine hydrochloride. Catalase activity was evaluated by sample incubation with hydrogen peroxide diluted in phosphate buffer and glutathione peroxidase activity was determined by a NADPH_2 oxidation reaction in the presence of hydrogen peroxide and glutathione reductase. Superoxide dismutase activity was determined in pH10 medium by measuring the inhibitory enzyme action on nitrobluetetrazolium reduction triggered by hydroxylamine – derived free radicals. The quantification of all the above described oxidative stress parameters was based on absorbances detected with a microplate reader (mQuant-Gen5 2.0 software, Biotek Instruments, Winooski, NT, USA).

mRNA expression of inflammasome genes

Total RNA was extracted from the lumbar spinal cord (Trizol reagent) and cDNA was synthesized by using the Kit High Capacity (Applied Biosystems). NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 and GAPDH gene amplifications were done by using the TapMan MasterMix with primers and probes inventoried and tested by Life Technologies. Assays were performed in duplicates in “Sequence Detection Systems” 1.2.3 – 7300 Real Time PCR Systems- Applied Biosystems and results were expressed based on fold difference by using the delta threshold ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) method.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation or as median (25–75%). Comparisons between two samples were made by *t*-test and more than three samples were made by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s test was used to compare parametric findings. Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test was employed to analyze and compare non-parametric findings. Disease incidence was evaluated by the Chi-square test. Statistical analysis was accomplished with SigmaPlot software version 12.0 (Jandel Corporation, USA) and $p < 0.05$ was considered significant. Difference between clinical scores was analyzed by the area under curve method.

Reference

1. Berge, T. *et al.* The multiple sclerosis susceptibility genes TAGAP and IL2RA are regulated by vitamin D in CD4⁺ T cells. *Genes and Immunity*. **17**, 1–10 (2016).
2. Alonso, A. & Hernan, M.A. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* .**71**, 129–135 (2008).
3. Garg1, N. & Smith, T.W. An update on immunopathogenesis, diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Brain and Behavior*. **5** (2015).
4. Ohl, K., Tenbrock, K. & Kipp, M. Oxidative stress in multiple sclerosis: central and peripheral mode of action *Experimental Neurology*. **277**, 58–67 (2016).
5. Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. & Okamura, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. **19**, 423-74 (2001).
6. Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H. & Lavelle, E.C. A crucial role for interleukin IL-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. **203**, 1685-91 (2006).
7. Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. **30**, 576-87 (2009).
8. Schmitt, N. *et al.* Lymphocytes human IFN- γ promoter in primary CD4+ T regulate the transcriptional activity of the cutting edge: IL-12 and IL-18 differentially. *J Immunol*. **160**, 3642-3647 (1998).
9. Mailer, R. K. W. *et al.* IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Scientific Reports*. **5**, 14674; 10.1038/srep14674 (2015).
10. Paré, A., Mailhot, B., Lévesque, S.A. & Lacroix, S. Involvement of the IL-1 system in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis: Breaking the vicious cycle between IL-1b and GM-CSF. *Brain, Behavior, and Immunity*. **62**, 1–8 (2017).
11. Pierrot-Deseillignya, C. & Souberbielleb J. C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. **14**, 35–45 (2017).
12. Hayes, C.E. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc. Nutr. Soc.* **59**, 531–535 (2000).
13. Freedman, D.M., Dosemeci, M. & Alavanja, M.C. Mortality from multiple sclerosis and exposure to residential and occupational solar radiation: a case–control study based on death certificates. *Occup. Environ. Med.* **57**, 418–421 (2000).
14. Holick, M.F. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry*. **88**, 296–307 (2003).
15. Nair, R. & Maseeh, A. Vitamin D: The "sunshine" vitamin. *Journal of Pharmacology &*

Pharmacotherapeutics. **3**; 118-126 (2012).

16. Farias, A.S. *et al.* Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DC and enhances Tregs, reducing the severity of EAE. *CNS Neurosci Ther.* **19**, 269–277 (2013).

17. Wang, Y.L. *et al.* SPK1-transfected UCMSC has better therapeutic activity than UCMSC in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis model of Multiple sclerosis. *Scientific Reports*. **8**, 1756; 10.1038/s41598-018-19703-5 (2018).

18. Lysandropoulos, A.P. *et al.* Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects. *J Neuroimmunol.* **233**, 240–244 (2010).

19. Mayne, C.G., Spanier, J.A., Relland, L.M., Williams, C.B. & Hayes, C.E. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* **4** (2011).

20. Heine, G. *et al.* 1,25- dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol.* **38**, 2210–8 (2008).

21. Cui, X., Gooch, H., Petty, A., McGrath, J. J. & Eyles, D. Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Molecular and Cellular Endocrinology.* **453**, 131-143 (2017).

22. DeLuca, G. C., S. Kimball, M., Kolasinski, J., Ramagopalan, S. V. & Ebers, G. C. Review: The role of vitamin D in nervous system health and disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* **39**, 458–484 (2013).

23. Eyles, D., Brown, J., Mackay-Sim, A., McGrath, J. & Feron, F. Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience.* **118**, 641-53 (2003).

24. Shinpo, K., Kikuchi, S., Sasaki, H., Moriwaka, F. & Tashiro, K. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cultured mesencephalic dopaminergic neurons to the combined toxicity caused by L-buthionine sulfoximine and 1-methyl-4-phenylpyridine. *J Neurosci Res.* **62**, 374–382 (2000).

25. Hart, P.H., Gorman, S. & Finlay-Jones, J.J. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol.* **11**, 584–596 (2011).

26. Penna, G. & Adorini, L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* **164**, 2405–2411 (2000).

27. Mathieu, C. Vitamin D and the Immune system: getting it right. *IBMS Bonekey.* **8**, 178–186 (2011).

28. Dimeloe, S., Nanzer, A., Ryanna, K. & Hawrylowicz, C. Regulatory T cells, inflammation

and the allergic response- The role of glucocorticoids and Vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **120**, 86–95 (2010).

29. Chambers, E.S. & Hawrylowicz, C.M. The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep.* **11**, 29–36 (2011).

30. Chiuso-Minicucci, F. *et al.* Treatment with vitamin D/MOG association suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* **12** (2015).

31. Mimura, L.A.N. *et al.* Association of myelin peptide with vitamin d prevents autoimmune encephalomyelitis development. *Neuroscience.* **317**, 130–140 (2016).

32. Won, S., Sayeed, I., Peterson, B.L., Wali, B., Kahn, J.S. & Stein, D.G. Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF- κ B signaling pathways. *Plos One.* **27** (2015).

33. Murphy, A.C., Lalor, S.J., Lynch, M.A. & Mills, K.H.G. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* **24**, 641-651 (2010).

34. Martin, B. N. T cell-intrinsic ASC critically promotes TH17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Immunol.* **17**, 583–592 (2016).

35. Adamczyk, B. & Adamczyk, S.M. New Insights into the role of oxidative stress mechanisms in the pathophysiology and treatment of multiple sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* **2016** (2016).

36. Mossakowski, A.A. *et al.* Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation. *Acta Neuropathol.* **130**, 799–814 (2015).

37. Dendrou, C.A., Fugger, L. & Friese, M.A. Immunopathology of multiple sclerosis *Nature Reviews Immunology.* **15** (2015).

38. Hemme, B., Kerschensteiner, M. & Korn, T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **14**, 406–19 (2015).

39. Karussis, D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *Journal of Autoimmunity.* **134**, 48-49 (2014).

40. Chua, F. *et al.* The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis *Journal of Neuroimmunology.* **318**, 1–7 (2018).

41. Kong, W., Hooper, K.M. & Ganea, D. The natural dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitor flavocoxid is protective in EAE through effects on Th1/Th17 differentiation and macrophage/microglia activation. *Brain, Behavior, and Immunity.* **53**, 59–71 (2016).

42. Zorzella-Pezavento, S.F.G., Mimura, L.A.N., Fraga-Silva, T.F.C., Ishikawa, L.L.W.,

- França, T.G.D. & Sartori A. Experimental autoimmune encephalomyelitis is successfully controlled by epicutaneous administration of MOG Plus Vitamin D analog. *Front. Immunol.* **8**, 1198; 10.3389/fimmu (2017).
43. Smolders, J. & Damoiseaux, J. Vitamin D as a T cell modulator in multiple sclerosis. *Vitam Horm.* **86**, 401–28 (2011).
44. Wrzosek, M. *et al.* Vitamin D and the central nervous system. *Pharmacological Reports.* **65**, 271-278 (2013).
45. Kiraly, S.J., Kiraly, M.A., Hawe, R.D. & Makhani, N. Vitamin D as a neuroactive substance: review. *The Scientific World Journal.* **6**, 125–139 (2006).
46. Ming, X. *et al.* Caspase-1 expression in multiple sclerosis plaques and cultured glial cells. *J Neurol Sci.* **197**, 9–18 (2002).
47. Gris, D. *et al.* NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol.* **185**, 974-81 (2010).
48. O'Connor, R.A. *et al.* Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **18**, 3750–4 (2008).
49. Takahashi, S. *et al.* Active form of vitamin D directly protects the blood–brain barrier in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology.* **8**, 244–254 (2017).
50. Soellner, I.A., Rabe, J., Mauri, V., Kaufmann, J., Addicks, K. & Kuerten, S. Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.* **149**, 519-29 (2013).
51. Kluver, H. & Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J. Nueropath. Exp. Neurol.* **12**, 400-403 (1953).
52. Walker-Caulfield, M.E., Hatfield, J.K. & Brown, M.A. Dynamic changes in meningeal inflammation correspond to clinical exacerbations in a murine model of relapsing–remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology.* **278**, 112–122 (2015).
53. Romualdo, R. *et al.* An integrative analysis of chemically-induced cirrhosis-associated hepatocarcinogenesis: Histological, biochemical and molecular features. *Toxicology Letters.* **281**, 84–94 (2017).

Acknowledgements

This work was supported by São Paulo Research Foundation-FAPESP (grant number 2013/26257-8).

Author contributions

LR, SF and AS contributed to the conception and design of this work. LR, SF, TF, LA LL and AA performed experiments. LR, TF, LA and LL contributed to data acquisition. LR, TF, LA, LL and AS contributed to data interpretation. LR and AS wrote the paper and all authors reviewed the manuscript and approved the final version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Figure Legends

Figure 1. Vit D3 effect on EAE incidence and severity. Disease incidence (a), clinical score (b), maximum clinical score (c) and body weight variation (d) were analysed until the 18 day after disease induction. Results were expressed as media \pm SEM (21 animals/group). Results from 4 independent experiments were combined. ANOVA, Tukey's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 2. Vit D3 effect on the degree of inflammation and demyelination at the CNS. Lumbar spinal cord section were stained with HE or LFB. Inflammatory infiltration in normal (a), EAE (b) and EAE/Vit D3 (c) groups; demyelination in normal (d), EAE (e) and EAE/Vit D3 (f) groups. Representative micrographs (scar bar 100 μ m) of 4 samples examined in each experimental group. The semi-quantitative analysis of the inflammatory infiltrate was performed according to the following criteria: absence of inflammatory infiltrate (0); focal meningeal infiltrates (1); more pronounced meningeal infiltrates (2) and pronounced meningeal and some parenchymal infiltration (3). Results were expressed as media \pm SEM (6 animals/group) (g). Results from 2 independent experiments were combined. ANOVA, Tukey's test *** $p < 0.001$.

Figure 3. Effects of Vit D3 on CNS permeability barrier and on local leukocyte infiltration. Naflu test (a); absolute cell number in the CNS (b); percentage of CD45^{high}CD11b⁻ (c); percentage of CD45^{high}CD11b⁺ (d); percentage of CD45^{low}CD11b⁺ (e). Representative dot-plots for c, d and e findings are shown in f, g and h, respectively. Permeability test and other assays were done 10 and 18 days after disease induction, respectively. Results were expressed as media \pm SEM (9-15 animals/group). Results from 3 independent experiments were combined. ANOVA, Tukey's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 4. Vitamin D3 down modulates MHCII expression in CNS infiltrating macrophages. Cells from the CNS were eluted 18 days after disease induction and median fluorescence intensity (MIF) associated with MHCII, PD-L1 and CD40 were evaluated in CD45^{high}CD11b⁺ and in CD45^{low}CD11b⁺. MHCII (a), PD-L1 (b) and CD40 (c) MIF associated with CD45^{high}CD11b⁺ cells and respective representative histograms (d). MHCII (e), PD-L1 (f) and CD40 (g) MIF associated with CD45^{low}CD11b⁺ cells and respective representative histograms (h). Results were expressed as media \pm SEM (9-15 animals/group). Results from 3 independent experiments were combined. ANOVA, Tukey's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 5. Level of CNS inflammasome activation in mice treated with Vit D3. The lumbar spinal cord was collected 18 days after disease induction and the expression level of mRNA for NLRP3 (a), ASC (b), caspase-1 (c), IL-18 (d) and IL-1 β (e) were obtained by real time PCR. The results are expressed as median, 25–75% (box), and minimum-maximum (error bars) (10 animals/group). Results from 2 independent experiments were combined. Kruskal-Wallis, Dunn's test * $p < 0.05$.

Figure 6. Level of oxidative stress in the CNS in mice treated with Vit D3. The CNS (brain plus spinal cord) was collected 18 days after disease induction. Oxidative stress indicators as lipid hydroperoxide (a) and protein carbonyl (b) and antioxidant enzymes as superoxide dismutase (c), catalase (d) and glutathione peroxidase (e) were assessed by biochemical reactions. Results were expressed as media \pm SEM (8-11 animals/group). Results from 2 independent experiments were combined. ANOVA, Tukey's test. * $p < 0.05$.



Conclusão

Conclusão

Nossos resultados indicam que a terapia precoce e constante com Vit D3 pode controlar a neuroinflamação na EAE. Os resultados também sugerem que esse efeito é mediado principalmente pela estabilização da BHE, evitando, portanto, a infiltração celular no SNC e o subsequente desencadeamento de estresse oxidativo e ativação do inflamassoma.