

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 30/07/2020.



**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.

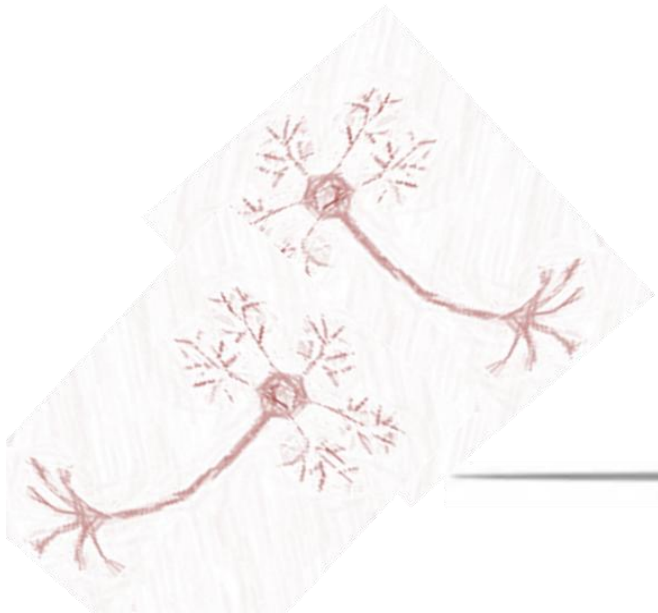


Resumo

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.

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.