

Efeito terapêutico diferencial da vitamina D3 e
do análogo Paricalcitol no desenvolvimento da EAE

Luiza Ayumi Nishiyama Mimura

Alexandrina Sartori

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de parasitas e microrganismos*.

Alexandrina Sartori

**BOTUCATU – SP
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeito terapêutico diferencial da vitamina D3 e
do análogo Paricalcitol no desenvolvimento da EAE

Luiza Ayumi Nishiyama Mimura

Alexandrina Sartori

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de parasitas e microrganismos*.

Alexandrina Sartori

**BOTUCATU – SP
2019**

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

Mimura, Luiza Ayumi Nishiyama.

Efeito terapêutico diferencial da vitamina D3 e do análogo paricalcitol no desenvolvimento da EAE / Luiza Ayumi Nishiyama Mimura. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Capes: 33004064

1. Encefalomielite autoimune experimental. 2. Esclerose múltipla. 3. Vitamina D. 4. Imunoterapia.

Palavras-chave: Paricalcitol; Vitamina D; encefalomielite autoimune experimental; esclerose múltipla.

Dedicatória

*Especialmente, à minha família
pelo apoio incondicional para tornar possível a realização dos
meus sonhos e pela formação do meu caráter.*

Agradecimentos

Agradeço,

À Alexandrina Sartori, minha orientadora. Pela confiança, orientação excepcional e pelos ensinamentos. É imensurável a sua contribuição para meu amadurecimento profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Doutorado (#2015/06706-8) e pelo auxílio regular (#2016/23317-8).

Às minhas companheiras de laboratório, que me deram suporte para a realização deste trabalho. Todos que passaram por este estágio da minha carreira serão lembrados com muito carinho e serei eternamente grata.

Aos professores Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, Dr. Luis Fernando Barbisan e Dra. Karen Ingrid Tasca pela contribuição durante o exame de qualificação.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo suporte técnico e acadêmico e à Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu pelo suporte técnico.

*Ao Departamento de Farmacologia e ao assistente técnico Hélio Kushima pela
utilização da Leitora de Microplacas BioTek.*

*À pessoa que desperta o melhor em mim, Danilo, por me acompanhar nesta
jornada e pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos
de incerteza.*

*Às minhas amigas-irmãs e seus respectivos, muito obrigada pelo apoio nos
momentos difíceis e por compartilharem tantas alegrias.*

Resumo

MIMURA, L.A.N. **Efeito terapêutico diferencial da vitamina D3 e do análogo Paricalcitol no desenvolvimento da EAE**, 2019. 82p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). A imunopatogênese da doença e do modelo, a encefalomielite autoimune experimental (EAE), envolve a ativação de diferentes populações de linfócitos, macrófagos e da microglia que liberam uma infinidade de mediadores pró-inflamatórios e radicais livres. A vitamina D3 (VitD) e seu análogo Paricalcitol (Pari) são dotados de atividade imunomoduladora e são utilizados em doenças autoinflamatórias e autoimunes. Recentemente, observamos que a VitD quando administrada logo após a indução da EAE controlava a doença com eficácia. Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar o potencial terapêutico da VitD e do Pari no desenvolvimento da EAE e avaliar se seriam eficazes em momentos mais avançados da doença. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com glicoproteína do oligodendrócito da mielina (MOG) emulsionada com adjuvante completo de Freund e foram tratados com VitD ou Pari (0,1g/animal, 15 dias alternados, i.p.). A terapia foi iniciada sete dias após a indução, quando a resposta autoimune já estava estabelecida ou dez dias após a indução, quando os primeiros sintomas eram evidentes. A terapia com VitD ou Pari não determinou proteção contra a EAE quando iniciada dez dias após a indução. Terapias iniciadas no sétimo dia após a indução geraram resultados distintos e inesperados. A VitD determinou redução do escore clínico e da expressão de MHCII, NLRP3 e CX3CR1 no SNC e aumento de neutrófilos no pulmão e na permeabilidade da barreira intestinal. O Pari não determinou efeito protetor significativo, entretanto reduziu a expressão de CX3CR1 no SNC e de RORc em células do pulmão e aumentou a produção de IL-6 e IL-17 no intestino. Concluímos que a VitD, mas não seu análogo Pari, é eficaz no tratamento da EAE mesmo quando administrada na fase pré-clínica. Experimentos adicionais estão sendo realizados para esclarecer os mecanismos deste efeito diferencial entre VitD e Pari.

Palavras-chave: encefalomielite autoimune experimental, esclerose múltipla, vitamina D e Paricalcitol

Abstract

MIMURA, L.A.N. **Differential therapeutic effect of vitamin D and Paricalcitol on experimental autoimmune encephalomyelitis**, 2019. 82p. Thesis (PhD) – Institute of Biosciences, São Paulo State University (Unesp), Botucatu, 2019.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). MS and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) immunopathogenesis involve T lymphocytes, macrophages and microglial cells whose activation will release a plethora of pro-inflammatory mediators and free radicals. Vitamin D3 (VitD) and its analog Paricalcitol (Pari) are endowed with immunomodulatory activity and are used in autoinflammatory and autoimmune diseases. Recently, we demonstrated that VitD was able to control EAE development when administered soon after disease induction. Therefore, the aim of this work was to compare the therapeutic potential of VitD and Pari to control EAE development and also to evaluate if this therapeutic approach is efficient to control ongoing disease. C57BL/6 mice immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein emulsified with complete Freund's adjuvant were intraperitoneally treated with VitD or Pari (0,1ug/animal, 15 every other day). Therapy was initiated 7 days post induction when the autoimmune response was already established or 10 days post induction when the first symptoms appeared. VitD or Pari therapy started ten days after induction did not determine protection. Therapy started seven days after disease induction brought forth unexpected results. VitD reduced disease severity, decreased MHCII, NLRP3 and CX3CR1 expression at the CNS, increased the percentage of neutrophils in the lungs and increased the permeability of the intestinal barrier. Pari therapy had no major protective effect; however it reduced CX3CR1 mRNA expression in the CNS, decreased expression of RORc in lung eluted cells and increased IL-6 and IL-17 production in the intestine. We conclude that VitD, but not its analog Pari, is effective to control EAE even if administered at the pre-clinical stage. Additional experiments are already being performed to elucidate the mechanisms involved in this differential effect of VitD and its analog.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, vitamin D and Paricalcitol

Sumário

Introdução

Esclerose múltipla	10
Encefalomielite autoimune experimental	12
Imunopatogênese da esclerose múltipla/encefalomielite experimental	13
Efeito imunomodulador da vitamina D3 e do Paricalcitol	17
Efeito da suplementação com vitamina D3 em pacientes e modelo experimental	20

Racional científico	23
----------------------------	----

Objetivos	23
------------------	----

Material & Métodos	25
-------------------------------	----

Resultados	31
-------------------	----

Discussão	45
------------------	----

Referências bibliográficas	51
-----------------------------------	----

Apêndices	59
------------------	----

I - Coautoria em publicações

II - Certificado do comitê de ética – CEUA

Introdução

Introdução

Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune que determina inflamação e desmielinização no sistema nervoso central (SNC). O alvo principal desta patologia é a bainha de mielina que reveste os neurônios. A doença acomete principalmente jovens adultos, na fase mais produtiva da vida, e por isto determina impactos socioeconômicos relevantes^{1,2}. Grande parte dos pacientes, após 15 anos do diagnóstico, apresenta limitações funcionais ou cognitivas e aproximadamente metade deles necessita de assistência para deslocar-se¹. A prevalência da EM é estimada em aproximadamente 2,3 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo maior prevalência na Europa e na América do Norte³. No continente americano a incidência é de 8,3 casos a cada 100.000 habitantes⁴ e a Associação Brasileira de EM estima que 35 mil brasileiros estão afetados pela doença atualmente. O diagnóstico da EM é estabelecido pela análise combinada da sintomatologia, exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) e observação de imagens de lesões no SNC⁵. As manifestações clínicas da EM são heterogêneas e incluem fraqueza de um ou mais membros, perda da visão, falta de coordenação motora, dor, depressão e fadiga⁶. A análise do LCR tem como objetivo a detecção de biomarcadores, como por exemplo, as bandas oligoclonais de IgG que são detectadas em mais de 95% dos pacientes com EM⁷. Basicamente, as análises de imagens obtidas por ressonância magnética identificam placas de lesões causadas pela desmielinização que podem estar localizadas tanto no encéfalo quanto na medula espinal, e que variam de tamanho e número dependendo da gravidade da doença⁸. A EM se apresenta bastante variável em termos de sintomatologia clínica e são reconhecidos quatro tipos, dependendo da dinâmica dos sintomas ao longo do tempo: a síndrome clinicamente isolada que é definida como um quadro transitório de sintomas que se resolve ao longo do tempo; a remitente-recorrente (EM-RR) que é a forma clínica que acomete a maioria dos pacientes e é caracterizada pelo aparecimento de surtos seguidos de períodos de recuperação dos sintomas; a secundária-progressiva (EM-SP) na qual ocorre piora dos sintomas com o passar do tempo devido ao acúmulo de lesões no SNC; e a forma primária-progressiva (EM-PP), caracterizada pela piora da incapacidade desde o início dos primeiros sintomas⁹.

EM é considerada uma doença de etiologia multifatorial sendo que diversas publicações apoiam esta possibilidade e evidenciam que a somatória de fatores genéticos e ambientais contribui para aumentar o risco do desenvolvimento da doença. Múltiplos fatores

contribuem para aumentar o risco do aparecimento ou agravamento da doença, como por exemplo, infecções virais, tabagismo, obesidade e deficiência de vitamina D3. Além disso, indivíduos expostos a dois fatores causais, por exemplo, tabagismo e determinados genes do complexo principal de histocompatibilidade (HLA), apresentam maior risco em comparação com a soma de cada risco individual^{10,11}.

Em relação aos fatores genéticos, os primeiros fatores de risco identificados foram as variantes associadas ao HLA. Os genes do HLA são polimórficos e as variantes de seus alelos estão associadas com susceptibilidade ou proteção de doenças autoimunes. Alelos de genes HLA classe II e classe I codificam moléculas envolvidas na apresentação de antígenos para linfócitos TCD4 e TCD8, respectivamente. As moléculas HLA classe II são expressas em células apresentadoras de antígeno (APCs) como células dendríticas (DCs) e macrófagos. Dentre diversos alelos, a variante HLA-DRB1*15:01 é uma das mais estudadas e sua presença é fortemente relacionada com a susceptibilidade e aumento do risco da EM¹². Porém, os alelos DRB1*11 ou B*44, estão associados à proteção diminuindo o risco de desenvolvimento de EM¹³. Embora os fatores de risco genético, como as variantes no alelo do HLA descrito acima, ainda não possam ser alterados, suas consequências na resposta imune podem ser manejadas por meio do entendimento de como elas afetam o risco de desenvolver EM, incluindo como elas interagem com os fatores de risco ambientais.

Uma das hipóteses em relação aos fatores ambientais é a participação de infecções bacterianas, fúngicas ou virais no agravamento da doença, sendo o mais investigado o vírus Epstein–Barr (EBV). Alta prevalência de infecção por EBV é detectada em pacientes com EM comparativamente aos indivíduos saudáveis¹⁴. Uma constatação interessante é a presença de antígeno nuclear 1 do EBV (EBNA-1) em vários indivíduos com EM. Em um estudo de caso-controle, indivíduos negativos para anticorpos anti-EBNA1 se converteram sorologicamente em positivos antes do aparecimento dos sintomas. Além disso, o risco de desenvolver EM parece estar associado ao período da infecção, sendo evidente durante a adolescência ou na fase adulta, mas não na infância^{15,16}. Vários mecanismos são propostos para elucidar como a infecção por EBV piora a doença. Uma delas, por exemplo, é o mimetismo molecular; células TCD8⁺ isoladas de pacientes com EM respondem tanto a antígenos da mielina quanto ao EBNA-1¹⁷.

A insuficiência de VitD vem sendo reconhecida como um fator ambiental importante no desenvolvimento de doenças inflamatórias. Um dos principais fatores associados a esta insuficiência é o nível de exposição aos raios UVB que é um estímulo indispensável para a produção desta vitamina pelos queratinócitos e fibroblastos da pele. Os hemisférios mais ao

norte em um contexto global e continental apresentam maior número de casos de EM devido à menor incidência destes raios. Por exemplo, na América do Norte o elevado índice da doença está associado com a baixa radiação UV nesta região. Além disto, a exposição aos raios UVB durante a fase infantil ou na adolescência diminui significativamente o risco de desenvolver EM¹⁸. Dois fatores adicionais contribuem para a diminuição de VitD associada com menor exposição ao sol. Um deles é o fenômeno Uthoff, caracterizado por agravamento dos sintomas neurológicos quando ocorre aumento da temperatura corpórea. O outro fator é a incapacidade física causada pela doença. Estas duas situações determinam menor exposição aos raios UVB e conseqüentemente maior déficit de VitD¹⁹.

Encefalomielite autoimune experimental – EAE

Os modelos experimentais são ferramentas essenciais para o entendimento de diversas doenças e também para o desenvolvimento de novas terapias. Apesar de ainda não haver um modelo ideal que mimetize exatamente os fenômenos imunopatológicos encontrados em humanos, as investigações sobre os mecanismos imunopatogênicos e sobre as novas terapias são realizadas utilizando diferentes modelos. Determinadas espécies de roedores ou primatas são geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento da EAE e dependendo do objetivo do estudo o melhor modelo pode ser escolhido. A doença pode ser induzida utilizando diversas metodologias, por exemplo, pela transferência de células específicas para mielina, sensibilização ativa do animal ou por infecções virais e administração de fármacos que causam desmielinização²⁰.

As diferentes linhagens de roedores geradas em laboratório são as mais utilizadas na pesquisa, pois apresentam vantagens como rápida reprodução e facilidade de manuseio e de manipulação genética. A EAE nestes animais pode ser induzida de forma ativa ou passiva. Na forma ativa são utilizados os seguintes reagentes: antígeno derivado do SNC, adjuvante e toxina pertussis, os quais promovem liberação lenta do antígeno, quebra da tolerância, aumento da permeabilidade da BHE, proliferação de células antígeno-específicas e produção de citocinas inflamatórias²¹. A forma passiva é induzida pela transferência de células T específicas para antígenos da mielina obtidas de animais com EAE. As duas linhagens de camundongos mais utilizadas na indução da EAE são a SJL e a C57BL/6 nas quais a doença é desencadeada através de imunização com proteína proteolípídica (PLP) ou com peptídeo derivado da glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG), respectivamente. Na linhagem SJL, os animais desenvolvem uma doença similar à doença remitente-recorrente

humana, caracterizada por surto seguido de melhora da sintomatologia. A EAE induzida no C57BL/6 é caracterizada pelo aparecimento de paralisia grave na fase aguda seguida de melhora dos sintomas, mas não de cura, na fase crônica. Ambos os modelos apresentam danos axonais desencadeados principalmente por subpopulações de linfócitos TCD4⁺, com lesões confinadas na medula espinhal e poucas alterações no encéfalo²⁰.

Os modelos de EAE disponíveis permitem investigar o envolvimento de diferentes células do sistema imune e do SNC na imunopatogênese e também avaliar novas terapias. Além disto, o acesso aos tecidos do SNC possibilita a avaliação de eventos que não são facilmente examinados no ser humano. Um exemplo interessante é a investigação de como as infecções fúngicas poderiam participar no desenvolvimento da doença, considerando que fungos patogênicos são encontrados em pacientes com EM²². Alguns dos tratamentos aprovados para uso em humanos foram inicialmente avaliados na EAE, como o acetato de glatiramer e o natalizumab, confirmando sua importância na pesquisa²³.

Imunopatogênese da esclerose múltipla/encefalomielite experimental

Ainda persistem muitas dúvidas em relação à imunopatogênese da EM. Entretanto, em linhas gerais, já estão disponíveis muitas informações acerca dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório que se instala no SNC resultando em desmielinização, morte dos oligodendrócitos, dano axonal, gliose e neurodegeneração^{24,25}. Linfócitos B, Th1, Th17 e Tc específicos para antígenos do SNC são ativados nos órgãos linfoides secundários antes de migrarem para o tecido-alvo onde são reativados por reconhecimento local de antígenos próprios, iniciando assim o processo de lesão inflamatória autoimune²⁶⁻²⁸. A liberação de autoantígenos é um aspecto que ainda precisa ser elucidado. Duas hipóteses têm sido consideradas: liberação de autoantígenos do SNC devido a uma injúria local ou infecções com patógenos, especialmente vírus, cujos antígenos apresentam mimetismo molecular com componentes da mielina. Está demonstrado que a ativação de células T auto-reativas na periferia pode desencadear danos no SNC. Pacientes com EM tratados com um peptídeo da mielina modificado, na tentativa de diminuir o percentual de células pro-inflamatórias, apresentaram aumento de resposta Th1, aparecimento de novas lesões e desenvolvimento de um novo surto²⁹.

Após a publicação de Odoardi et al., (2012)³⁰, a ideia de “licensing” foi estabelecida. Esta hipótese de que células auto-reativas passam por outros órgãos e são licenciadas (tornadas encefalitogênicas) antes de adentrar no SNC adveio da observação de que células T

auto-reativas, ativadas *in vitro* antes da transferência, levavam alguns dias para serem detectadas no SNC. Além disto, foi constatado que estas células eram eficazes na indução da doença quando administradas na circulação, mas não quando colocadas diretamente no LCR. Células encefalitogênicas presentes no pulmão se caracterizam por aumento de expressão de genes codificantes de quimiocinas as quais permitem migração destas células para o SNC. Recentemente, o baço³¹ e as leptomeninges³² também foram descritos como órgãos que participam deste fenômeno. Corroborando com esta hipótese, foi comprovado que a inflamação pulmonar pode interferir no decurso da EAE; a inflamação impede a migração de células Th17 para o SNC devido ao aumento de expressão de CCL20 no pulmão, quimiocina esta responsável pela atração destas células³³.

A quebra da barreira hematoencefálica (BHE) é outro evento fundamental na entrada de células inflamatórias no SNC³⁴. A desregulação da BHE e a migração transendotelial dos leucócitos ativados estão entre as primeiras alterações cerebrovasculares observadas na EM. Esta quebra da BHE é um processo complexo que inclui a participação de citocinas, em especial IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , quimiocinas, junções celulares, leucócitos, moléculas de adesão e células endoteliais do SNC³⁵. As células Th17 também contribuem para a ruptura da BHE e para o processo inflamatório; a expressão de receptores para IL-17 e IL-22 foi detectada em células endoteliais da BHE em locais com lesões³⁶. Após a entrada de células encefalitogênicas no SNC, ocorre a reativação de células efectoras por interação com as APCs locais tais como microglia e astrócitos, que amplificam o processo de inflamação. Estudos mostram que estes fagócitos internalizam e degradam a bainha de mielina, dando início aos processos inflamatório e de desmielinização^{37,38}. O processo inflamatório é mediado por espécies reativas de oxigênio (EROs) que oxidam a maioria dos componentes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, provocando alterações estruturais e funcionais³⁹. Níveis elevados de EROs também contribuem para aumentar a permeabilidade da BHE, facilitando a migração de células ativadas para o SNC³⁴. Autópsias revelaram a presença de lipídeos oxidados nas bainhas de mielina em regiões de lesão ativa em pacientes com EM⁴⁰.

O estresse oxidativo está diretamente associado com um sistema denominado inflamassoma, o qual amplifica os danos determinados pelas EROs. O inflamassoma é um complexo proteico macromolecular composto por um sensor molecular, a proteína adaptadora ASC e a protease caspase-1 e é ativado em resposta às infecções, dano tecidual ou desequilíbrios metabólicos, iniciando programas celulares responsáveis pela maturação e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18 e morte celular^{41,42}. Os sensores

moleculares do inflamassoma pertencem à família de receptores celulares denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs)⁴³ ou moléculas próprias associadas ao dano (DAMPs)⁴⁴. Dentre os PRRs, se destacam os receptores NLRs (receptores de ligação a nucleotídeo contendo domínio com sequência repetida de resíduos do aminoácido leucina) os quais são sensores citoplasmáticos que reconhecem PAMPs e DAMPs, monitorando desse modo compartimentos intra e extracelulares para sinais de infecção ou injúria tecidual⁴⁵. O inflamassoma NLRP3 é o que se encontra melhor descrito até o momento e está amplamente associado às doenças inflamatórias crônicas e autoimunes⁴⁶. A literatura sugere fortemente que a ativação do inflamassoma esteja relacionada com a progressão da EM, visto que a liberação das citocinas IL-1 β e IL-18 que atuam na diferenciação e manutenção das células Th1 e Th17, subpopulações celulares responsáveis pela patogênese da doença, é dependente da ativação do inflamassoma⁴⁷⁻⁴⁹. Além disso, se observa elevada expressão de caspase-1 nas lesões no SNC e nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com EM⁵⁰.

A subpopulação de linfócitos mais abundante em pacientes com EM é a dos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) que participam ativamente da neuroinflamação e se apresentam em grande número em lesões ativas^{51,52}. Além da presença no parênquima, estas células podem estar presentes no LCR e no sangue^{53,54}. Sob condições inflamatórias, células TCD8⁺ podem reconhecer e lisar células do SNC tais como astrócitos, oligodendrócitos e neurônios que expressem moléculas de MHC I⁵⁵. Estudo realizado com biópsias de pacientes revelou uma correlação positiva entre a quantidade de células TCD8⁺ e o acúmulo da expressão da proteína precursora de amiloide que é indicadora de dano axonal⁵⁶. Apesar da proporção de células TCD4⁺ ser menor que células TCD8⁺ nas lesões da EM, elas desempenham um papel fundamental na patogênese. Análises *in situ* realizadas em amostras de SNC mostraram que há expressão de IL-17 em linfócitos, astrócitos e oligodendrócitos localizados nas áreas de lesões ativas e crônicas⁵⁷. A frequência de células Th17 se apresenta alta no LCR de pacientes com MS remitente-recorrente durante as recidivas comparado com pacientes em remissão da doença⁵⁸. Ensaio *in vitro* com PBMCs de pacientes (remitente-recorrente no estágio inicial da doença) mostrou que essas células respondem ao antígeno MBP produzindo altos níveis de citocinas do perfil Th1 e Th17, como IFN- γ , IL-6, GM-CSF e IL-17⁵⁹.

Os linfócitos B contribuem para o estado inflamatório da doença através de diferentes mecanismos: produção de anticorpos, produção de citocinas pró-inflamatórias e também como APCs para linfócitos T⁶⁰. Avaliações histopatológicas mostram que estas células podem ser encontradas no espaço perivascular e no parênquima e também em agregados celulares

presentes nas meninges de pacientes com EM-SP^{61,62}. Elevada expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 foi detectada em células B de pacientes⁶³. Além disto, pacientes com perfil do tipo EM-PP apresentavam alta produção de citocinas inflamatórias por células B, como IL-6, IL-12 e TNF- α ⁶⁴.

As células reguladoras também desempenham papel importante na doença. Alguns trabalhos mostram redução da população FoxP3⁺ em pacientes com EM; entretanto outros descrevem que a frequência é similar à encontrada em indivíduos saudáveis. Independente da quantidade, estas células supressoras são geralmente menos responsivas quando estimuladas *in vitro*, produzindo menos IL-10. Estas células podem apresentar redução da expressão de moléculas inibitórias como o CTLA-4 ou ter sua migração comprometida^{65,66}. Também foram descritas diferentes subpopulações de linfócitos B reguladores em pacientes com EM; o efeito supressor destas subpopulações está usualmente associado à produção de IL-10 e inibição da proliferação e diferenciação de células T⁶⁰. Células TCD8⁺ também apresentam ação reguladora através da supressão e morte de células TCD4⁺ ou pela indução de indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em APCs⁶⁷. Na EAE, células T reguladoras também estão presentes, pois a forte inflamação leva à diferenciação e recrutamento destas células que participam no controle da inflamação e da supressão de células efetoras²¹. Os macrófagos e microglia também podem apresentar perfil anti-inflamatório (M2) durante as fases mais tardias da doença experimental ou humana, produzindo citocinas anti-inflamatórias como a IL-10⁶⁸.

Publicações mais recentes destacam a participação do intestino na EM e EAE, incluindo alterações na barreira intestinal e na microbiota. O grupo de Nouri et al., 2014⁶⁹ demonstrou que durante o decurso da EAE ocorre aumento da permeabilidade intestinal (PI) devido ao ambiente inflamatório no intestino causado pela presença de células Th1 e Th17 nos linfonodos locais. O tratamento com um probiótico determinou redução da PI, preservando as junções epiteliais e determinando redução da gravidade da EAE⁷⁰. Pacientes com o tipo EM-RR em estado clínico ativo, apresentavam alterações na microbiota e aumento de células Th17 na mucosa intestinal⁷¹. Ainda está em debate qual é a participação dos tratamentos utilizados na EM na modulação da microbiota, pois não está claro se a disbiose é resultado da doença ou se precede o desenvolvimento da doença⁷².

Apesar da semelhança na imunopatogênese, existem diferenças consideráveis entre o modelo animal e a doença humana. O modelo animal apresenta limitações, como por exemplo: a evolução de células do sistema imunológico, o ambiente de manutenção dos animais que não remete à realidade humana (SPF- animais livres de patógenos específicos), a homogeneidade das cepas e a utilização de adjuvantes para a indução da doença. Estes

aspectos parecem relevantes, pois tratamentos eficazes no modelo experimental seguidamente estão associados com complicações ou ineficácia em pacientes⁷³. O perfil histopatológico no humano caracteriza-se por lesões heterogêneas e dispersas enquanto que no camundongo a inflamação se restringe à medula espinal e ao cerebelo. Existem diferenças nítidas nos tipos celulares que participam das lesões no SNC; células TCD4⁺ específicas para antígenos são as mais abundantes no modelo experimental enquanto que nos humanos há uma grande percentagem de células TCD8⁺ e linfócitos B. Essa discussão tem se baseado no fato de que tratamentos direcionados para células TCD8⁺ determinam resultados positivos enquanto que aqueles destinados às células TCD4⁺ tem efeito mais discreto^{74,75}.

Onze fármacos estão disponíveis para a terapia da EM e são baseadas principalmente em imunomodulação visando redução da gravidade e da frequência de recidivas⁹. Os corticosteroides são utilizados na fase aguda da doença. Já os fármacos imunomoduladores, como o IFN- β e o acetato de glatiramer, são utilizados em pacientes com quadros de exacerbação e remissão da doença. Esses dois medicamentos impedem ativação, proliferação e migração de células inflamatórias para o SNC^{76,77}. Pacientes que não respondem bem a essa primeira linha de tratamento são submetidos ao uso do natalizumabe, um anticorpo monoclonal que se liga a cadeia $\alpha 4$ da integrina VLA-4, inibindo a adesão entre linfócitos e células endoteliais dos vasos sanguíneos no SNC, reduzindo assim o tráfego de linfócitos através da BHE⁷⁸. O fingolimode, que sequestra os linfócitos nos órgãos linfoides secundários, atuando sobre o receptor para esfingosina-1-fosfato, mostrou-se capaz de reduzir o infiltrado inflamatório no SNC por impedir a migração de linfócitos ativados e também por possuir um efeito neuroprotetor direto nas células do SNC^{79,80}. As terapias disponíveis não curam a EM e sua eficácia varia entre os pacientes, além disto, causam efeitos colaterais como o aumento de suscetibilidade aos agentes infecciosos, reações alérgicas e problemas gastrointestinais⁸¹.

Efeito imunomodulador da vitamina D3 e do análogo Paricalcitol

Os primeiros estudos sobre a atividade do hormônio $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (VitD; calcitriol) foram direcionados para a regulação da homeostasia de cálcio e fósforo. Mas posteriormente ficou evidenciado que seus efeitos biológicos se estendem a diversos tipos celulares, como por exemplo, células do sistema imunológico e do SNC^{82,83}. Este efeito tão amplo e relevante

da VitD no sistema imune está relacionado com a presença de receptores para VitD (VDR) na maioria das células deste sistema, principalmente após estimulação das mesmas⁸⁴.

A principal fonte de VitD é sua síntese por células da pele expostas aos raios UV; pode também ser obtida em menor quantidade através da ingestão de alimentos. Após a conversão em 7-deidrocolesterol na pele a mesma é transportada pela proteína ligadora da vitamina D (DBP, vitamin D binding protein) através do sangue e no fígado ocorre a primeira hidroxilação formando a 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)VD₃) que é a forma circulante. Por fim, a 25(OH)VD₃ é metabolizada nos rins para a forma ativa 1,25(OH)₂VD₃. Além disso, células do sistema imune são capazes de produzir a enzima 25-hidroxivitamina D₃ 1- α -hidroxilase que converte a forma circulante da vitamina D na forma ativa⁸⁵.

Os efeitos da VitD podem ser observados em praticamente todas as células do sistema imune incluindo tanto as da resposta inata quanto adaptativa. A sua atividade reguladora na imunidade inata pode ser diretamente nas células (monócitos/macrófagos, DCs, neutrófilos) ou sobre outros componentes deste sistema, como as células da barreira intestinal. A VitD aumenta a atividade microbicida de monócitos/macrófagos pela produção de peptídeos antimicrobianos, como β -defensina 2 e catelicidina⁸⁵, e diminui a produção de derivados de O₂, NO e de citocinas pró-inflamatórias^{86,87}. Outros trabalhos ressaltam sua propriedade antioxidante; a adição de VitD *in vitro*, em culturas de monócitos aumentou significativamente os mecanismos antioxidantes e também a formação de glutatona reduzida, resultando em redução de EROs e de citocinas pró-inflamatórias⁸⁶. O efeito supressor da VitD *in vitro* também tem sido ressaltado. Células da microglia previamente ativadas apresentaram aumento na expressão do VDR e do gene *Cyp27b1*, responsável pela codificação da enzima 1- α -hidroxilase. O contato subsequente destas células com VitD determinou redução da produção de citocinas pro-inflamatórias através de indução de IL-10 e de SOCS3⁸⁸. DCs humanas diferenciadas na presença de calcitriol são imaturas e se caracterizam por expressão reduzida de CD1a, MHC II, CD40, CD80 e CD86⁸⁹. Estas células também produzem menor quantidade de IL-12 e maior concentração de IL-10. Estes efeitos em conjunto determinam uma condição tolerogênica na qual estas células se tornam incapazes de estimular a proliferação de células T. Este fenômeno tem sido atribuído à geração de Tregs, pois a cocultura de DCs pré-tratadas com calcitriol e células T CD4⁺CD25⁺ leva à indução de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺^{90,91}. Além disto, na presença de VitD ocorre aumento na expressão de CTLA-4 e CD25 e na capacidade supressora das Tregs⁹².

No sistema imune adaptativo a VitD pode atuar sobre células Th1 inibindo a produção de IFN- γ através da supressão da transcrição dos genes destas citocinas ou através da

produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-10, por células Th2^{93,94}. Em relação à migração de células T, a VitD aumenta a expressão do receptor CCR9, associado ao “homing” no intestino e inibe a expressão de CXCR3 em células T, diminuindo suas propriedades de migração para o tecido alvo⁹⁵. A VitD atua também diretamente em células TCD8⁺. No modelo de colite experimental, Chen et al., (2014)⁹⁶ descreveram que a ausência do VDR em células TCD8⁺ determina sua rápida proliferação no intestino contribuindo para a produção de IL-17 e IFN- γ no local. Em relação ao efeito em células T produtoras de IL-17, Hamzaoui e colaboradores (2014)⁹⁷ evidenciaram o efeito anti-inflamatório da VitD; a adição inibiu a diferenciação de células TCD4⁺ em células TCD4⁺IL-17⁺ tanto em pacientes com asma quanto em controles saudáveis. O efeito da VitD sobre as células B inclui inibição da síntese de IgE e indução da produção de IL-10⁹⁸. De forma similar ao efeito em outras APCs, a VitD também reduz a expressão de moléculas co-estimulatórias em células B⁹⁹.

A hipercalcemia é um fator que restringe a utilização da VitD; este fenômeno ocorre devido a um aumento da ligação VitD-VDR e consequente aumento da absorção de cálcio no intestino e rins e da mobilização do cálcio depositado nos ossos¹⁰⁰. A mobilização do cálcio pode determinar o aumento do risco de quedas e fraturas principalmente em pacientes idosos. Sintomas comuns da hipercalcemia são: problemas neuropsiquiátricos, gastrointestinais, renais e cardiovasculares¹⁰⁰. Por esta razão foram desenvolvidos diversos análogos sintéticos da VitD que conservam os efeitos pleiotrópicos mas que não causam hipercalcemia. Dentre os análogos, o Paricalcitol (19-nor-1 α ,25(OH)2D2 - Pari) foi desenvolvido para o tratamento de hiperparatireoidismo secundário, sendo considerado uma droga “seletiva” para o VDR, ou seja, com afinidade mais alta para células da glândula paratireoide do que para o intestino e os ossos¹⁰¹. O mecanismo da atuação seletiva do Pari e de outros análogos não está totalmente elucidado; as possibilidades descritas na literatura são baseadas em análises comparativas com a VitD. Em relação ao efeito do Pari na reabsorção óssea (homeostasia do cálcio), tem sido demonstrado que o Pari é pelo menos 10 vezes menos potente do que a VitD em induzir a mobilização de Ca⁺ nos ossos¹⁰². Ensaio *in vitro* indicou que esta menor potência do Pari em estimular a reabsorção óssea se deve, em parte, à sua degradação vinte vezes maior¹⁰³. Esta menor capacidade de reabsorção óssea do Pari também tem sido atribuída à menor indução de calbindin-D, molécula relacionada com a expressão do canal de transporte de cálcio e responsável pelo aumento de absorção do cálcio no intestino¹⁰⁴. Existe inclusive uma hipótese interessante que atribui a menor eficiência dos análogos justamente ao próprio fenômeno da hipercalcemia. Em um trabalho publicado em 2005, os autores estabeleceram um modelo animal que desenvolvia hipercalcemia através da incapacidade de sintetizar a VitD ativa e

pela administração de PTH. Demonstraram que essa condição por si só protegia os animais do desenvolvimento da EAE¹⁰⁵.

Alguns efeitos imunomoduladores associados ao Pari têm sido descritos, com ênfase em ensaios relativos a doenças renais. O perfil de DCs, por exemplo, é alterado quando VitD e Pari são acrescentados ao processo de diferenciação destas células por LPS; ocorre redução da expressão de moléculas co-estimuladoras e de HLA-DR e também se observa aumento da expressão de PDL-1. Além disto, estas DCs determinaram menor expansão de células T antígeno específicas quando colocadas em co-cultura¹⁰⁶. Ensaio interessante utilizou células-tronco mesenquimais (MSCs) e o Pari como adjuvante na diferenciação de células Th17 e no tratamento *in vivo* de animais com obstrução unilateral uretral. Quando células TCD4⁺ foram cultivadas com diferentes concentrações de Pari ocorreu inibição dose-dependente da produção de IL-17. O Pari não teve efeito sobre a proliferação das células TCD4⁺, porém a expressão de CCR6, receptor importante no recrutamento de células Th17 para o local da inflamação, estava reduzida. Além disto, em ensaio *in vivo* com Pari, não foi constatado efeito sobre a expressão de STAT3, ROR γ t, IRF4, e Runx1, porém ocorreu redução de macrófagos com perfil M1 nos rins¹⁰⁷. Outro estudo realizado com o mesmo modelo animal do trabalho acima, indicou que o Pari reduz a expressão do mRNA do TNF- α nos rins interferindo na sinalização do NF- κ B pelo aumento de expressão do VDR¹⁰⁸. Ensaio *in vitro* com PBMC de pacientes portadores de doença renal crônica, demonstraram que o Pari também foi capaz de reduzir a produção de IL-17, IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ ¹⁰⁹. No contexto da resposta imune em células tumorais, o Pari induz apoptose, clivagem da caspase-3 e inibição da fosforilação de genes associados ao crescimento tumoral¹¹⁰.

Efeito da VitD em pacientes e modelo experimental

Como descrevemos anteriormente, existe uma relação entre insuficiência de VitD e EM. Entretanto, apesar da grande quantidade de publicações demonstrando os efeitos da suplementação de VitD, ainda não há consenso sobre diversos aspectos, pois os trabalhos divergem em questões metodológicas, como por exemplo, a quantidade de VitD administrada ou o tipo de EM dos pacientes. Investigações sugerem que a suplementação ou a normalização dos níveis de VitD proporcionam efeito benéfico no desenvolvimento da doença. Um exemplo desta situação é o caso dos países nórdicos onde são esperados altos índices de EM, entretanto a doença é menos prevalente, o que tem sido atribuído a grande

ingestão de peixes e derivados¹¹¹. Em relação à quantidade ideal de VitD, a academia brasileira de neurologia, em 2014, publicou o consenso no qual ficaram acordados os seguintes aspectos: VitD deve ser monitorada/dosada em pacientes com EM, níveis de VitD abaixo de 30ng/mL devem ser corrigidos em todos os tipos de MS e níveis acima de 100ng/mL devem ser evitados¹¹². Há apenas um trabalho com o análogo Pari no qual onze pacientes que apresentavam EM-RR foram tratados com Pari; neste caso a administração do Pari não preveniu novas lesões, entretanto, não foram constatados efeitos adversos*.

Em diversos trabalhos tem sido atestado o efeito imunorregulador da VitD sobre o sistema imune e o SNC. Citocinas anti-inflamatórias e células com papel regulador se apresentam aumentadas em pacientes suplementados com VitD. O trabalho de Mosayebi et al. (2011)¹¹³, mostrou que a suplementação de pacientes por 6 meses determinou aumento nos níveis de TGF- β . Ensaio *in vitro* com células de pacientes com EM, revelou que a adição de VitD em células com perfil inflamatório, produtoras de IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22 e GM-CSF, determinou redução na porcentagem e produção de citocinas e aumento da produção de células FoxP3¹¹⁴. A população de células Th17 e os níveis de IL-17 também diminuíram após tratamento com VitD^{114,115}.

O efeito modulador da VitD tem sido investigado de forma mais detalhada em estudos empregando EAE. A VitD atua sobre as Tregs aumentando a expressão de CTLA-4 determinando assim aumento na sua capacidade de supressão; além disto, controla diretamente a expressão do fator de transcrição Foxp3⁹². A transferência adotiva de DCs tolerogênicas induzidas por VitD acarretou aumento na população de células B reguladoras na periferia e inibiu a infiltração de células Th1 e Th17 encefalitogênicas no SNC¹¹⁶. Nos últimos anos, mostramos que a inoculação MOG, na presença de VitD, preveniu o desenvolvimento da EAE em camundongos C57BL/6, tanto como abordagem terapêutica¹¹⁷ quanto profilática¹¹⁸. No SNC, a VitD atua, por exemplo, em células da microglia. Células da microglia ativadas e expostas à VitD apresentaram redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentaram a expressão de IL-10; esta redução ocorreu via indução da SOCS3⁸⁸. A VitD também determina efeitos neuroprotetores como, por exemplo, o aumento na capacidade de proliferação/diferenciação de células-tronco neurais em neurônios e oligodendrócitos¹¹⁹. Considerando o efeito calcêmico da VitD, investigamos a eficácia da coadministração de MOG e Pari por via epicutânea, que se mostrou significativamente eficaz no controle da doença, reduzindo o escore clínico e a desmielinização. Além disto, em ensaio *in vitro*, demonstramos que a microglia (BV-2) quando tratada com Pari apresentou menor expressão de MHCII e menor produção de IL-6 e NO¹²⁰. A revisão bibliográfica deste assunto

indica que não existem publicações adicionais sobre o uso do Pari na EAE, entretanto seu efeito pleiotrópico¹²¹ e potencialmente imunomodulador na artrite¹²² e na fibrose peritoneal¹²³ vêm sendo ressaltado. Em alguns trabalhos o efeito da VitD e do Pari são comparados. Sochorová et al. (2009)¹⁰⁶ descreveram que o Pari mantém o efeito imunomodulador da VitD e que ambos comprometem a maturação de DCs. Por outro lado, Pacini et al. (2013)¹²⁴ observaram que, em cultura de cardiomioblastos, a VitD induziu proliferação celular e o Pari induziu diferenciação celular e modificação na morfologia das células.

Racional científico & Objetivos

Racional científico do projeto

Recentemente constatamos que o tratamento precoce com VitD determinou redução significativa do estresse oxidativo e da ativação do inflamassoma¹²⁵. A precocidade deste tratamento (24 horas após a indução da EAE), não permite prever, entretanto, sua eficácia em estágios mais adiantados desta doença. Por esta razão avaliamos a eficácia terapêutica da VitD em outros momentos da EAE. Além disto, na tentativa de evitar a hipercalcemia, avaliamos seu análogo Pari que já é empregado em outras doenças inflamatórias.

Objetivo geral

Avaliar o efeito clínico e imunomodulador da VitD e do Pari em períodos mais tardios da evolução da EAE.

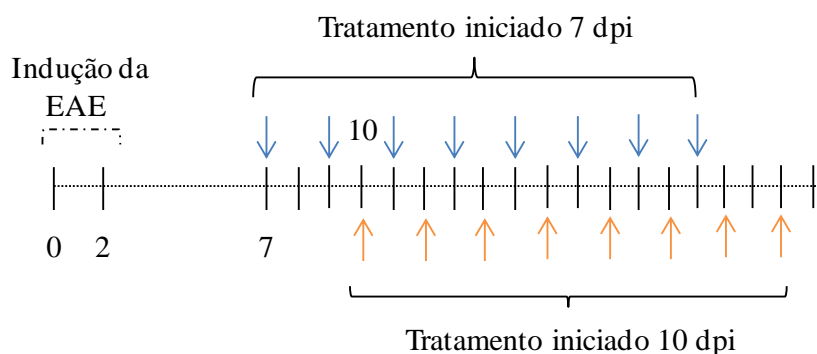
Objetivos específicos

- 1) Avaliar se a VitD e o Pari controlam o desenvolvimento da EAE de forma similar.
- 2) Avaliar os efeitos imunomoduladores da VitD e do Pari sobre a resposta imune periférica e no SNC.
- 3) Avaliar o efeito dos fármacos na barreira intestinal e na barreira hematoencefálica.
- 4) Determinar o perfil de células dendríticas diferenciadas *in vitro* com VitD e Pari.

Material & Métodos

Delineamento experimental

Os animais foram alocados em quatro grupos experimentais: CTL (saudáveis); EAE (submetidos à indução da doença e injetados com veículo); EAE/VitD (submetidos à indução da doença e tratados com VitD) e EAE/Pari (submetidos à indução da doença e tratados com Pari). Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com oito doses em dias alternados de VitD, Pari ou veículo. O protocolo terapêutico está ilustrado abaixo (dpi: dias pós indução). Peso corpóreo e escore clínico foram avaliados diariamente e os experimentos realizados ao final da terapia



Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (fêmeas) com oito semanas de idade, provenientes da Universidade de São Paulo (USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os animais receberam ração autoclavada e água filtrada *ad libitum*. Os experimentos foram realizados conforme os regulamentos da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu (Protocolo nº1099).

Indução de EAE e avaliação clínica

Camundongos C57BL/6 foram injetados, por via subcutânea no dorso, com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ (Genemed Synthesis Inc., Texas, EUA) em 50 µl de Adjuvante Completo de Freund (ACF) (Sigma Aldrich Corp., Missouri, EUA) contendo 4 mg/mL *Mycobacterium tuberculosis*. No dia da indução e 48 horas depois, os animais foram inoculados com 200ng de toxina pertussis via intraperitoneal. O peso corpóreo e os sinais clínicos da doença foram avaliados diariamente. A gravidade da doença foi definida conforme 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.

Tratamento com VitD e Pari

0,1 ug/dia de Vitamina D3 (D1530-Sigma) ou Paricalcitol (Zemplar®, Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, EUA) foram injetados por via i.p. Os grupos CTL e EAE foram injetados com veículo na mesma frequência.

Níveis séricos de cálcio e fósforo

Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina e o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado e o soro armazenado a -20°C. O cálcio e fósforo foram dosados conforme instrução do fabricante (Cálcio Arsenazo III e Fósforo UV, Bioclin, Quibasa Química Brasil Ltda, MG).

Cultura celular

Baço e linfonodos inguinais (LNs) foram coletados, desagregados em *cell strainers* e as células ressuspensas em meio completo, contendo 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e 4 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich). Células do baço e dos LNs foram ajustadas na concentração de 5×10^6 e $2,5 \times 10^6$ células/mL, respectivamente. Ambas as culturas foram reestimuladas *in vitro* com MOG (20µg/mL) e incubadas em estufa de CO₂ (5% CO₂/37°C) durante 48 horas. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. A quantificação de citocinas foi realizada através do ensaio imunoenzimático (ELISA), seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems e BD Biosciences).

Isolamento de células mononucleares do SNC

Cérebro e medula espinal foram coletados e o tecido incubado com 2,5 mg/mL de colagenase D (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA) e 100 µg/mL de DNase (Sigma-Aldrich) a 37°C por 45 min. A suspensão foi desagregada em *cell strainers* e lavada com solução tamponada (HBSS), após centrifugação o pellet foi então ressuspensado em Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) 30% e delicadamente adicionado sobre o Percoll 70%. As amostras foram centrifugadas a $950 \times g$ por 20 min em centrífuga com o freio desligado. O anel contendo células mononucleares foi coletado e o pellet lavado duas vezes com HBSS. A concentração celular foi ajustada para 1×10^6 para citometria de fluxo.

Histopatologia da medula espinal

Amostras de medula espinal foram coletadas e fixadas em formalina 10% tamponada e submetidas à inclusão em paraplast. As amostras foram cortadas e coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e Luxol Fast Blue (LFB) para avaliação de infiltrado inflamatório e desmielinização, respectivamente.

Ensaio de permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE)

A permeabilidade da BHE foi avaliada pela administração de NaFlu como descrito por Zorzella-Pezavento et al., 2017¹²⁰. Em síntese, os animais receberam por via i.p. 100 µl da solução fluoresceína sódica 10% (NaFlu- Sigma Aldrich). Após 20 minutos, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina e o sangue coletado por punção cardíaca. Em seguida, os animais foram perfundidos com 10 mL de solução salina 0,9 % e o cérebro e medula espinal foram coletados e pesados. Os órgãos foram macerados com pistilo na presença de 400µL de salina 0,9% e centrifugados. Sobrenadantes e plasma foram recolhidos (100 µL) e colocados em duplicatas em placa preta de 96 poços. Poços contendo somente salina 0,9% foram utilizados como branco. A leitura das amostras foi realizada em fluorímetro Synergy 4 (Biotek Instruments) com emissão/excitação de 485/528 e sensibilidade em 35. Os resultados obtidos na leitura foram expressos em unidades relativas de fluorescência (RFU).

Ensaio de permeabilidade da barreira intestinal (BI)

A permeabilidade da BI foi avaliada pela administração de NaFlu como descrito por Nouri et al.⁶⁹. Os animais receberam 10 µg/grama de animal de NaFlu (Sigma) por via oral. Após 60 minutos, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina e o sangue coletado por punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas, o plasma recolhido e colocados em duplicatas (100 µL) em placa preta de 96 poços. A leitura das amostras foi realizada em fluorímetro Synergy 4 (Biotek Instruments) com emissão/excitação de 485/528 e sensibilidade em 35. Curva padrão de NaFlu foi utilizada como referência.

Explante de intestino – cultura do tipo imersão

Esta metodologia foi adaptada dos procedimentos descritos por Bareiss et al. (2008) e Randall (2011)^{126,127}. Resumidamente, o jejuno foi removido em condições assépticas e lavado com HBSS contendo 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma). Os fragmentos (aproximadamente 1 cm) foram cortados longitudinalmente e a face interna (mucosa) posicionada para cima em placas de cultura com 24 poços, um pedaço por poço. Em cada

poço foram adicionados 0,5 ml de RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% FBS (Gibco) e 1% antibiótico/antimicótico (1% - Sigma). A cultura foi incubada em estufa de CO₂ (5% CO₂/37°C) durante 6 horas e o sobrenadante coletado e armazenado em -20°C.

Isolamento de células infiltrantes do pulmão

O pulmão foi coletado, desagregado com pistilo e o tecido incubado com 2,5 mg/mL de colagenase D (Roche) e 100 µg/mL de DNase (Sigma) a 37°C por 45 min. A suspensão foi desagregada em *cell strainers* e lavada com RPMI. Após centrifugação o pellet foi tratado com tampão de lise (NH₄Cl 0,15M), lavado e então ressuspenso em RPMI completo. As células foram ajustadas para 1x10⁶ para citometria de fluxo ou cultura celular.

Geração in vitro de células dendríticas

Células da medula óssea foram coletadas dos fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 saudáveis através do influxo de RPMI (Sigma). 2x10⁶ células foram plaqueadas em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 10 mL de RPMI suplementado com 20 mg/L de gentamicina (Sigma Aldrich), 2% de L-glutamina (Sigma), 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e 50 µM de 2-β-mercaptoetanol (Amersham BioSciences, UK) e incubadas em estufa (5% CO₂/37°C). Após 72 horas de cultura o meio foi removido e foram adicionados RPMI suplementado com 20 ng/mL de GM-CSF (Peprotech). No sexto dia de cultura, as células fracamente aderentes foram coletadas, centrifugadas e incubadas em placas de Petri contendo RPMI suplementado e GM-CSF. Após oito dias de cultura as células fracamente aderentes foram coletadas e ativadas com 10 ng/mL of LPS (O111:B4 – Sigma) e incubadas. Nos dias 3, 6 e 8 foram adicionados, nas células tratadas, 10 nM de VitD ou Paricalcitol. No nono dia de cultura, ou seja, 24 horas após a ativação com LPS, células fracamente aderentes foram coletadas e centrifugadas; o sobrenadante foi armazenado a -20°C e as células preparadas para citometria de fluxo.

Citometria de fluxo

A caracterização das diferentes subpopulações celulares e quantificação de citocinas foram realizadas por citometria de fluxo segundo instruções do fabricante dos anticorpos (eBioscience e BD™ Cytometric Bead Array (CBA), respectivamente). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA) do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu. A análise das subpopulações celulares e quantificação de citocinas foram realizadas no software

FlowJo Phenotypic (TreeStar, Ashland, OR, EUA) e no FCAP Array™ Software Version 3.0 (BD Bioscience).

rt-PCR e q-PCR

O RNA total foi extraído com Trizol (Life Technologies, Austin, TX, USA) e a síntese de cDNA foi realizada com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA). 12.5 ng de cDNA foram usados para reação de PCR em tempo real pelo sistema TaqMan™ Gene Expression Assay (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. A expressão dos seguintes genes foi testada: TBX21, RORC, FOXP3, CX3CR1, S1PR1, CCL17, NLRP3, CASPASE-1, IL-1 β , TNF- α , iNOS, IL-10 e IDO1. Os resultados foram calculados pelo método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) ou pela curva padrão.

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 a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

Resultados

Resultados

O efeito terapêutico da VitD depende do estágio da doença

A administração da VitD no período pré-clínico (7 dias após indução da doença) controlou o desenvolvimento da EAE. Comparativamente ao grupo não tratado, esta terapia reduziu o escore clínico de forma significativa (Figuras 1A e 1B). O adiamento do início do tratamento para o dia 10 após a indução da EAE, quando foram observados os primeiros sintomas clínicos, perdeu a eficácia como ilustrado nas figuras 1E e 1F. O tratamento com VitD em ambos os períodos determinou perda significativa de peso, como mostrado nas figuras 1C, D, G e H.

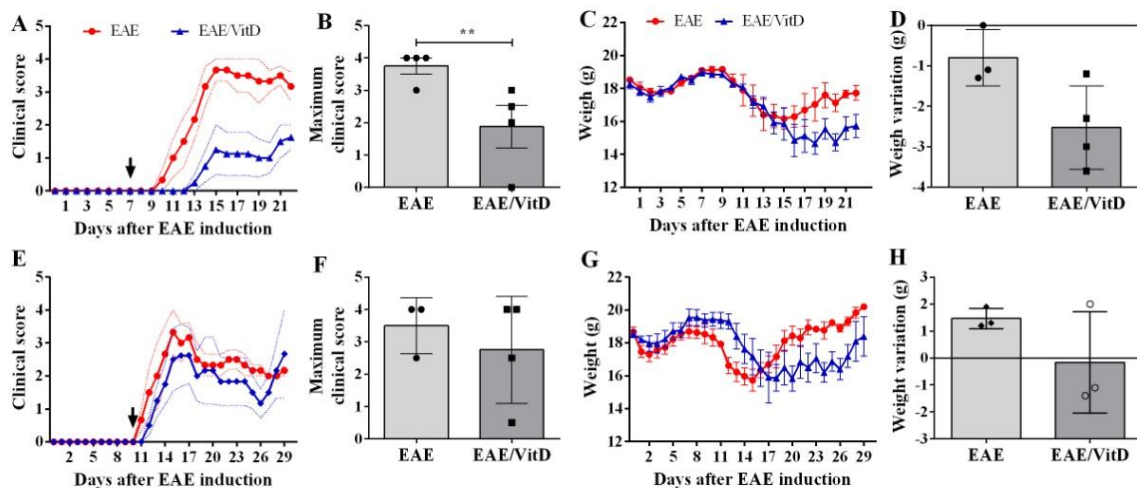


Figura 1. Administração de VitD a partir do 7^o. dia após indução da EAE reduziu o desenvolvimento clínico da doença. Camundongos C57BL/6 foram submetidos à indução de EAE e tratados com VitD por via i.p. O tratamento foi iniciado 7 ou 10 dias após indução da EAE e o peso e escore clínico foram avaliados diariamente. Escore clínico (A), escore clínico máximo (B), peso corporal diário (C) e variação de peso (D) em animais cujo tratamento foi iniciado no dia 7. Escore clínico (E), escore clínico máximo (F), peso corporal diário (G) e variação de peso (H) em animais cujo tratamento foi iniciado no dia 10. Os resultados são representativos de 5 experimentos independentes, expressos em média \pm SEM, **p<0,01 e o n=3-4 camundongos por grupo.

Terapia pré-clínica com VitD, mas não com seu análogo Paricalcitol, controla o desenvolvimento da EAE

A eficácia da terapia com VitD iniciada na fase pré-clínica foi confirmada por escores clínicos significativamente mais baixos (Figuras 2A e 2B). Entretanto, esta eficácia foi associada com perda acentuada de peso corporal (Figura 2D e 2E) e hipercalcemia (Figura 2C). Apesar de não aumentar os níveis séricos de cálcio, o análogo não determinou efeito terapêutico quando administrado 7 (Figuras 2A e 2B) ou 10 dias (não mostrado) após indução da EAE. Não foram detectadas diferenças nos níveis séricos de fósforo entre os diferentes grupos experimentais (Figura 2F).

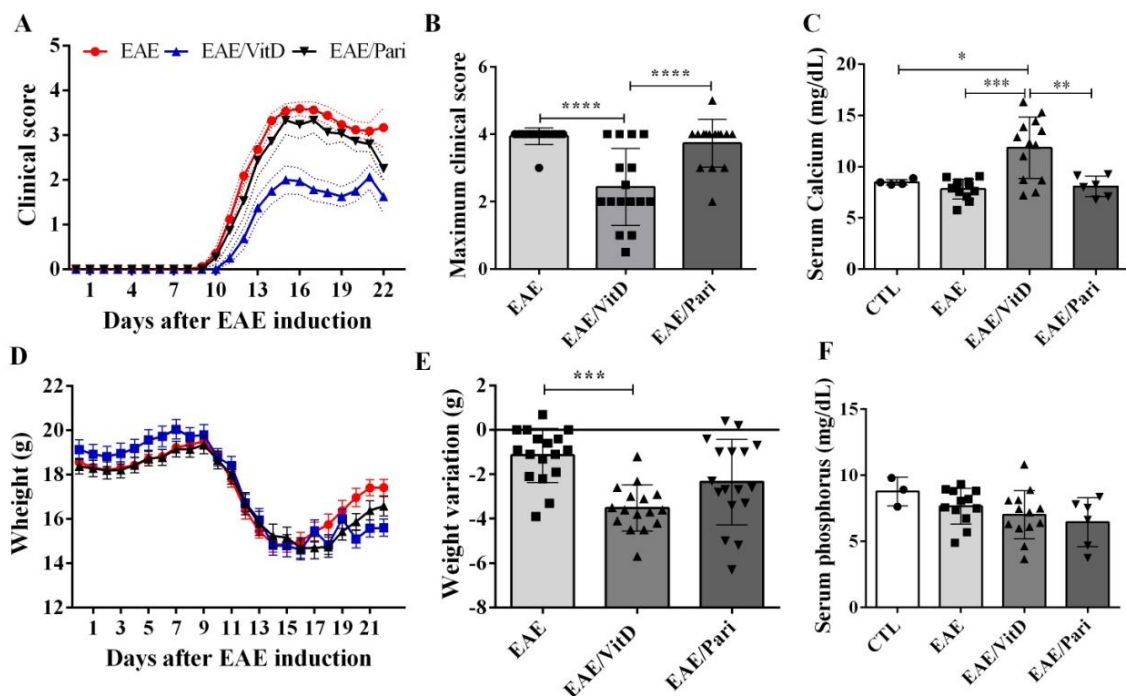


Figura 2. Administração pré-clínica de VitD, mas não de Pari, reduziu o escore clínico. Camundongos C57BL/6 foram tratados com VitD ou Pari por via ip. O tratamento foi iniciado 7 dias após indução da EAE e escore clínico e peso corporal foram avaliados diariamente e amostras de sangue foram coletadas 24 horas após a última dose dos fármacos. Escore clínico (A), escore clínico máximo (B), cálcio sérico (C), peso corporal diário (D), variação de peso (E) e concentração sérica de fósforo (F). Os resultados são representativos de 5 experimentos independentes, expressos em média \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e o $n = 3-17$ camundongos por grupo.

VitD e Pari determinam efeitos distintos sobre a produção de citocinas por culturas de baço e de linfonodos regionais

A terapia com VitD determinou efeitos oposto sobre a produção de citocinas por culturas de baço e de linfonodos inguinais. A produção de IFN- γ (Figura 3B), IL-17 (Figura 3C), TNF- α (Figura 3D), IL-2 (Figura 3F) e IL-6 (Figura 3F) por células esplênicas foi mais elevada no grupo tratado com VitD do que no grupo EAE controle. De forma distinta, estas mesmas citocinas, no caso das culturas de linfonodos inguinais, foram produzidas em níveis mais baixos pelos animais do grupo EAE/VitD do que pelo grupo controle EAE como mostrado na figura 3. A produção destas citocinas pelo baço não foi afetada pela administração de Pari (Figura 3). Exceto IFN- γ (Figura 3H) e IL-2 (Figura 3K), que foram produzidas em níveis levemente menores pelo grupo EAE/Pari, as demais citocinas produzidas pelos linfonodos do grupo EAE/Pari não foram afetadas. O número de células esplênicas nos três grupos experimentais foi similar (Figura 3A), mas nos linfonodos inguinais o número foi menor nos grupos EAE/VitD e EAE/Pari em comparação com o grupo EAE (Figura 3G).

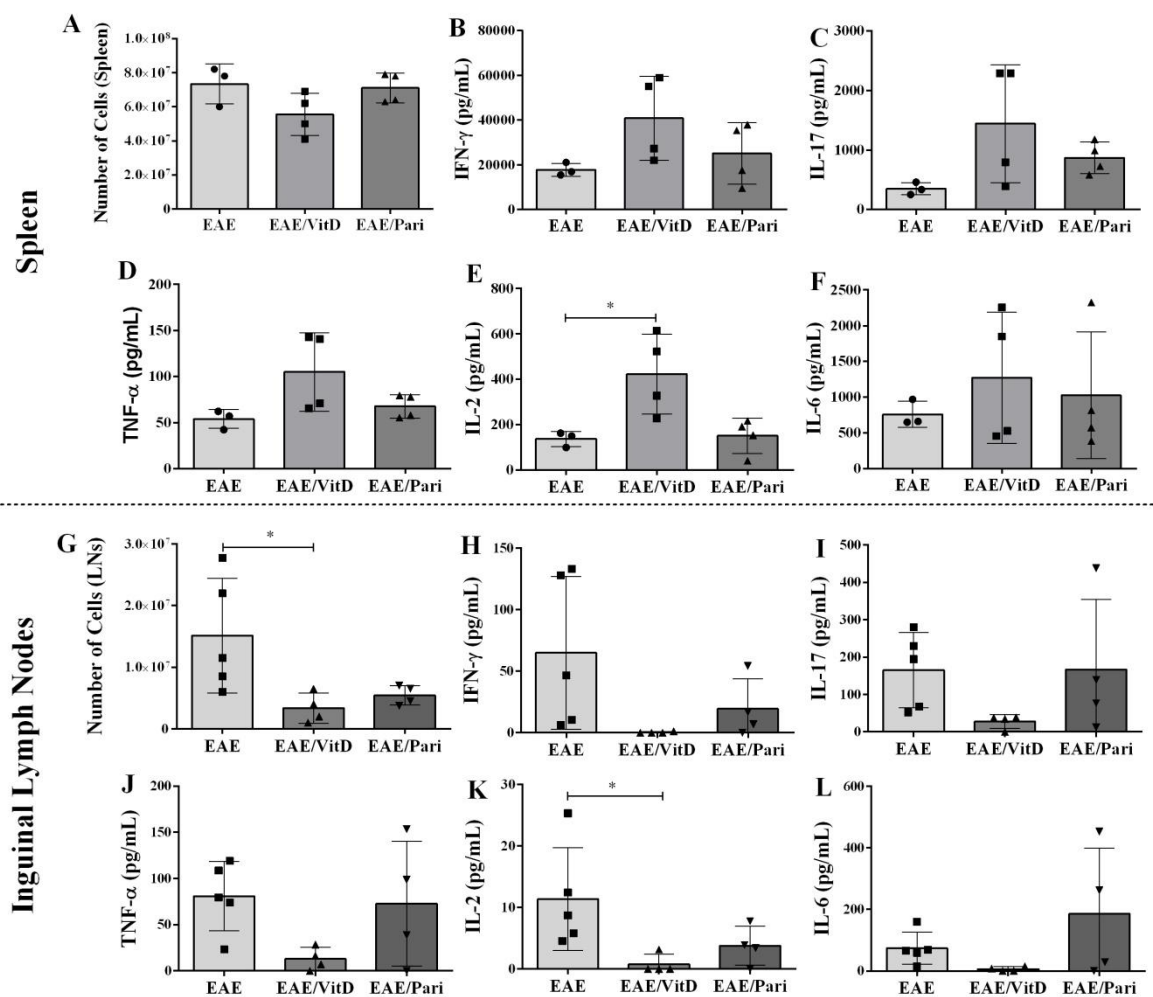


Figura 3. Efeito de VitD e Pari na produção periférica de citocinas O tratamento com VitD e Pari foi iniciado 7 dias após a indução de EAE. Número de células (A,G) e níveis de IFN- γ (B,H), IL-17 (C, I) , TNF- α (D, J), IL-2 (E,K) e IL-6 (F,L). A concentração das citocinas foi determinada em sobrenadantes de culturas de baço e de linfonodos inguinais estimuladas *in vitro* com MOG. Os resultados são representativos de 1 experimento, expressos em média \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e o $n = 3-4$ camundongos por grupo.

A presença de VitD ou Pari durante processo de diferenciação de DCs determina fenótipos distintos

Células de medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6 foram diferenciadas em DCs na presença de VitD ou Pari e os marcadores fenotípicos e a produção de citocinas foram avaliados. A frequência de células CD11c⁺ foi menor na presença de VitD do que na presença de Pari (Figura 4A). A presença de VitD determinou menor percentual de células expressando

MHCII e CD86 (Figura 4B e 4D). A frequência de células expressando PDL-1 aumentou em ambos os grupos (Figura 4E). A produção de IL-23, TNF- α e IL-6 (citocinas relacionadas com Th1/Th17) aumentou nas células tratadas com VitD comparativamente ao grupo controle (Figuras 4G- I). Os níveis de todas as citocinas testadas estavam mais elevados no grupo Pari comparativamente aos grupos EAE (controle) e EAE/Pari (Figuras 4F-J). Já a produção de IL-12p70 e TNF- α foi mais baixa nas células tratadas com VitD do que naquelas tratadas com Pari (Figura 4F e 4H).

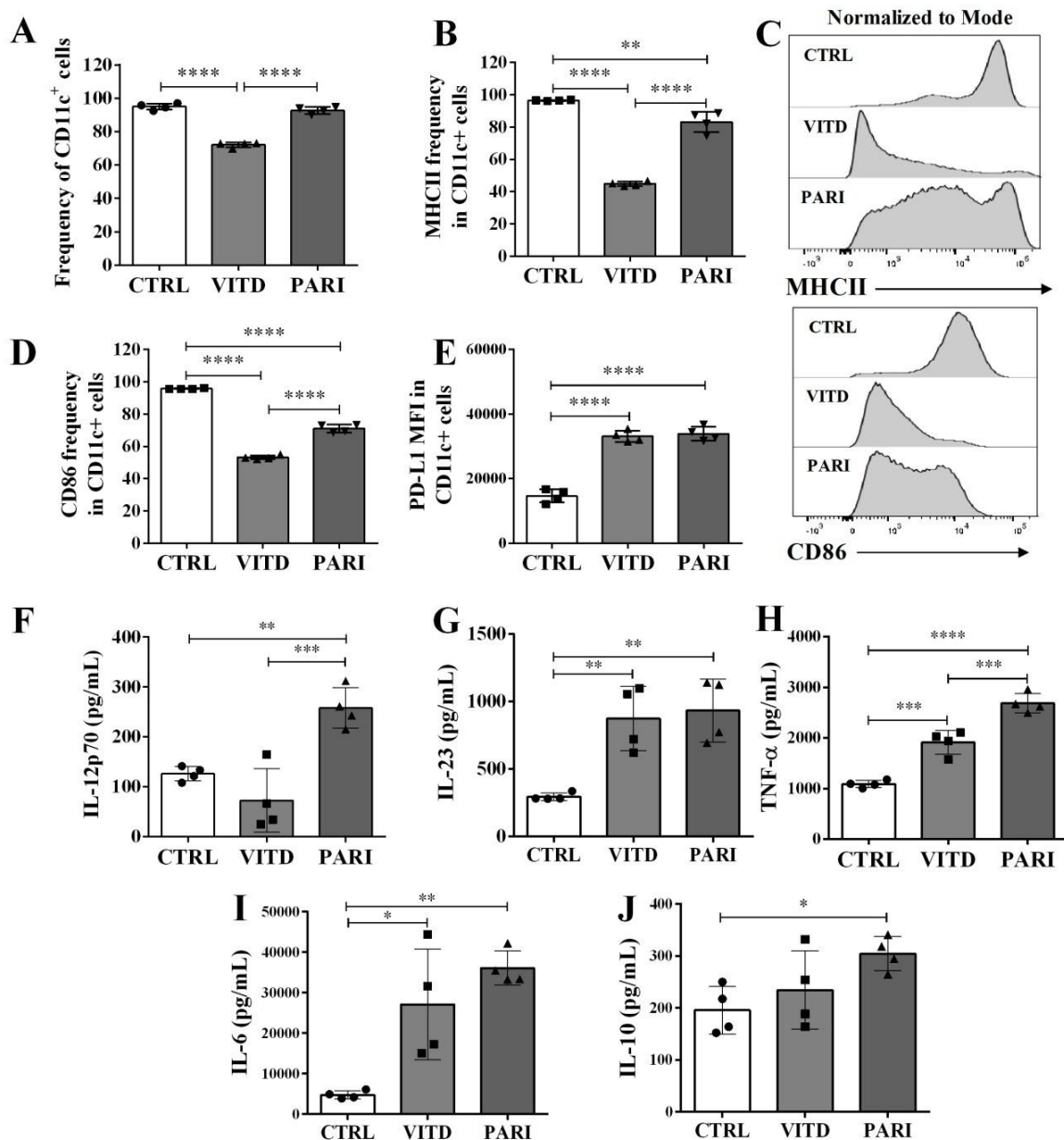


Figura 4. Efeito da VitD e do Pari na diferenciação *in vitro* de DCs. DCs foram geradas a partir de células oriundas da medula óssea de camundongos C57BL/6. VitD ou Pari foram adicionados às culturas durante o período de diferenciação. Células CD11c⁺ (A) foram determinadas em FSC-AxSSC-A (não mostrado). Histogramas correspondentes aos percentuais de MHCII e CD86 em células CD11c⁺ DCs (C). Frequência de células expressando MHCII (B) ou CD86 (D) e MFI relativo à expressão de PD-L1 (E) foram determinadas em células CD11c⁺ DCs. As citocinas IL-12p70 (F), IL-23 (G), TNF-α (H), IL-6 (I) e IL-10 (J) foram quantificadas nos sobrenadantes das DCs. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, expressos em média ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e o n=4 amostras por grupo.

O tratamento com VitD desencadeia acúmulo de PMN nos pulmões

Não foram observadas diferenças, durante a fase aguda, quanto ao número total e percentual de células CD3⁺ eluídas do pulmão dos quatro grupos experimentais como mostrado nas figuras 5B e 5C, respectivamente. Entretanto, constatamos um decréscimo no percentual de células CD11c^{High} (Figura 5D) e um aumento significativo no percentual de polimorfonucleares (PMN) no grupo tratado com VitD (Figura 5E).

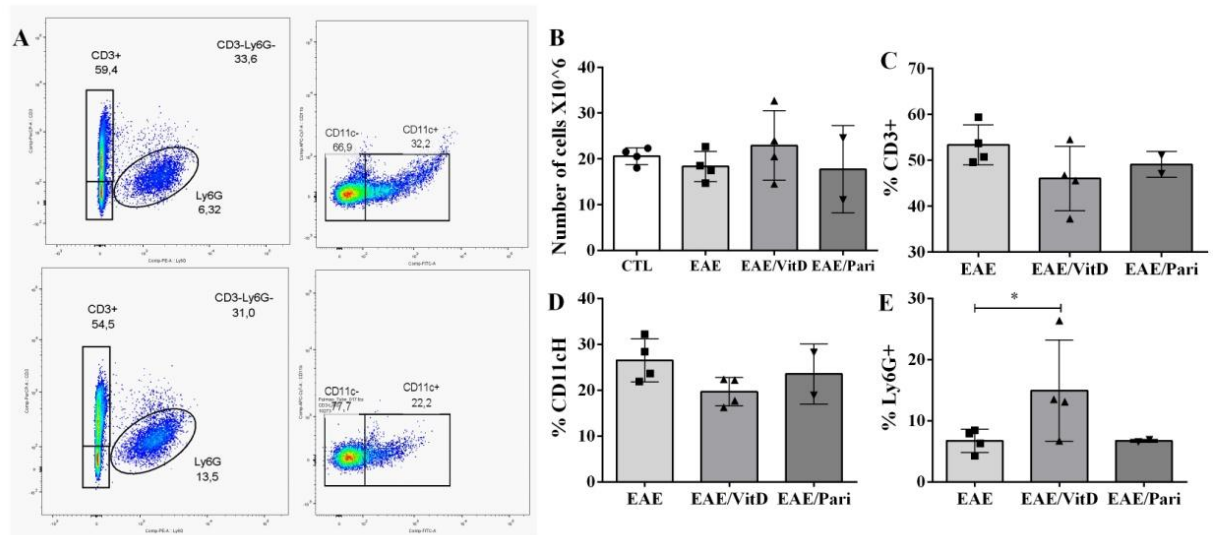


Figura 5. Células Ly6G⁺ se acumulam no pulmão de camundongos tratados com VitD. Camundongos C57BL/6 foram tratados com VitD ou Pari após a indução da EAE e as células totais do pulmão foram eluídas, contadas (B) e analisadas por citometria de fluxo. Estratégia de gate (A), percentual de células CD3⁺ (C), CD11c^{High} (D) e Ly6G⁺ (E). Os resultados são representativos de um experimento, expressos em média ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e o n=2-4 camundongos por grupo.

Perfil das células acumuladas no pulmão no período pós-licenciamento

Células eluídas de pulmão de camundongos tratados com VitD apresentaram uma leve redução na expressão de RORc (figura 6D) e FOXP3 (figura 6G). Os resultados observados nos animais tratados com Pari foram mais pronunciados; neste caso observou-se maior

redução no nível de mRNA destes dois fatores e também na expressão de TBX21 (Figuras 6D, G e A). A produção de IFN- γ por estas células (Figura 6B) foi semelhante nos 3 grupos experimentais mas a produção de IL-17 (Figura 6E) e de IL-10 (Figura 6H) foi reduzida por ambos os tratamentos. CX3CR1, S1PR1 e CCL17 (Figuras 6C, F e I) também foram downmodulados, sendo a inibição mais acentuada nos animais tratados com Pari do que com VitD.

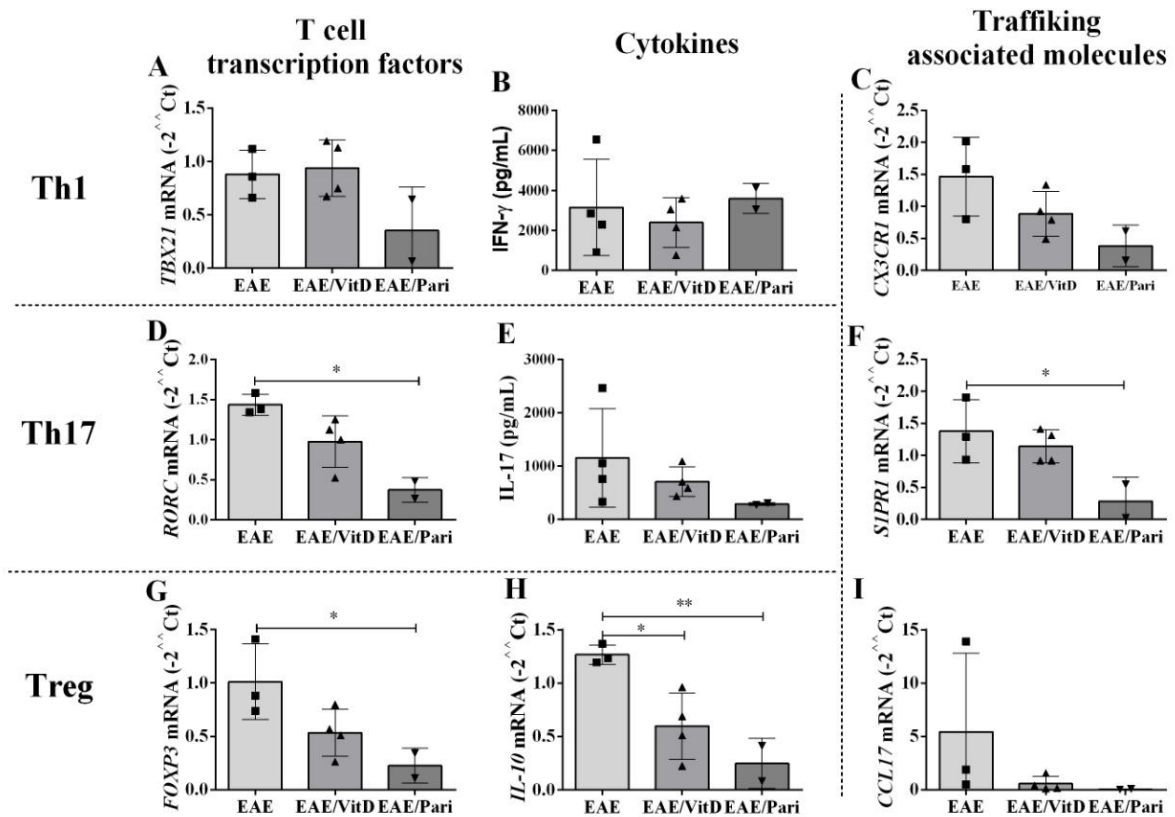


Figura 6. Efeito da VitD e do Pari sobre subpopulações de células T, citocinas e marcadores de migração no pulmão. Camundongos C57BL/6 foram tratados com VitD ou Pari a partir do 7^o dia após a indução de EAE. A expressão de mRNA para TBX21 (A), RORc (D), FOXP3 (G), CX3CR1 (C), S1PR1 (F), CCL17 (I) e IL-10 (H) foi determinada diretamente em células eluídas de pulmão enquanto que os níveis de IFN- γ (B) e IL-17 (E) foram quantificados em sobrenadante de culturas destas células estimuladas com MOG. Os resultados são representativos de um experimento, expressos em média \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e o $n = 2-4$ camundongos por grupo.

O tratamento com VitD determina menor inflamação e degeneração no SNC

O número de células infiltradas no SNC de animais tratados com VitD foi significativamente menor do que o número encontrado em animais dos grupos EAE não tratado ou tratado com Pari (Figura 7A). Esta redução na inflamação foi confirmada pela avaliação de cortes da medula espinal corados com H&E e também pela análise de cortes corados com LFB que indicaram menor grau de desmielinização (Figuras 7D). A expressão de MHCII na população de macrófagos infiltrantes/microglia ativada e também na microglia em repouso foi significativamente diminuída pelo tratamento com VitD (Figuras 7F e G). O grupo tratado com VitD apresentou um aumento na permeabilidade da BBB como ilustrado na figura 7C.

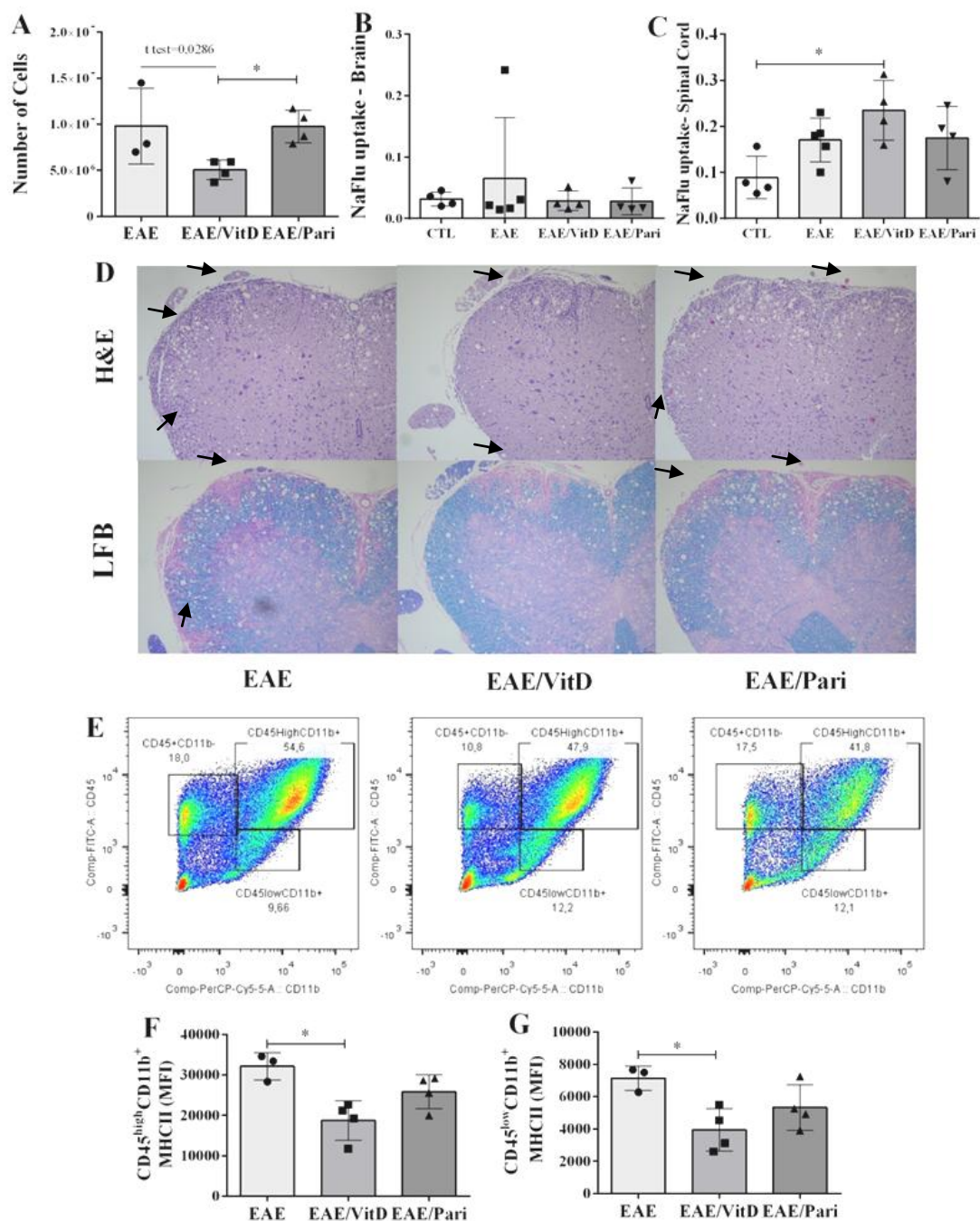


Figura 7. Efeito do tratamento com VitD na inflamação e desmielinização na medula espinal. Camundongos C57BL/6 foram tratados com VitD ou Pari por via i.p. a partir do 7º dia após a indução da doença. Número de células eluídas do SNC (A), ensaio de permeabilidade de barreira no cérebro (B) e na medula espinal (C), avaliação de infiltrado inflamatório e de desmielinização por H&E e LFB (D), estratégia de gates para análise de linfócitos, macrófagos infiltrantes/microglia ativada e microglia em repouso (E) e MFI referente a MHCII em macrófagos infiltrantes/microglia ativada e microglia em repouso (F e G). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, expressos em média \pm SEM, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e o n = 3-4 camundongos por grupo. As setas indicam áreas com inflamação e desmielinização.

O tratamento com VitD reduz ativação do inflamassoma, moléculas associadas com migração e citocinas na medula espinal

Avaliações feitas a partir da medula espinal indicaram menor ativação local do inflamassoma em animais tratados com VitD do que com Pari; os níveis de caspase-1 e IL-1 β foram levemente menores (Figuras 8D e 8C) enquanto que os relativos ao NLRP3 estavam significativamente diminuídos (Figura 8A). Os níveis de mRNA para CX3CR1 e TNF- α também estavam mais baixos no grupo tratado com VitD do que com Pari (Figuras 8B e 8F). O nível de expressão de iNOS estava significativamente maior no grupo tratado com Pari comparativamente aos grupos EAE e EAE/VitD (Figura 8G). Além disto, parâmetros indicativos de controle de inflamação, tais como FOXP3, CCL17 e IL-10 também foram reduzidos pelo tratamento com VitD mas não com Pari (Figuras 8H, E e I).

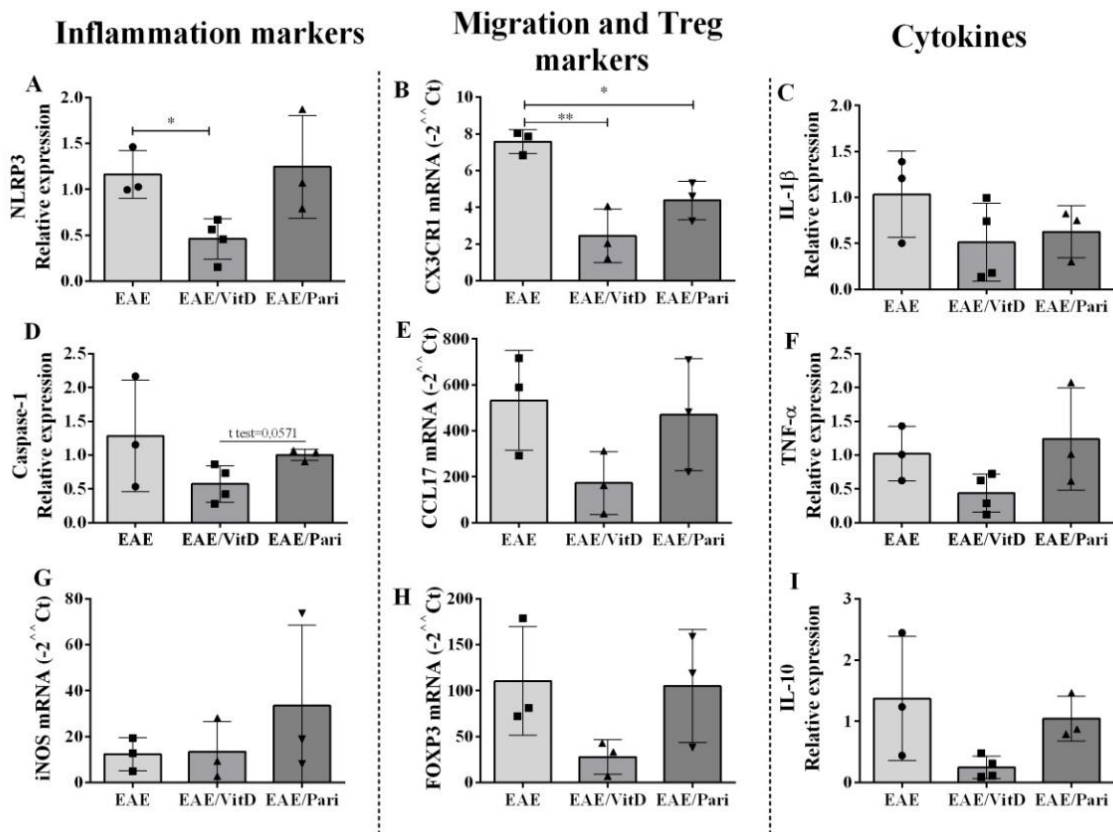


Figura 8. Efeitos da VitD e do Pari no inflamassoma, marcadores de migração celular e citocinas. Camundongos C57BL/6 foram tratados com VitD ou Pari por via i.p. a partir do 7^o dia após a indução da doença. Os níveis de expressão de mRNA de NLRP3 (A), CX3CR1(B), IL-1 β (C), Caspase-1 (D), CCL-17 (E), TNF- α (F), iNOS (G), FOXP3(H) e IL-10 (I) foram

quantificados na medula espinal. Os resultados são representativos de um experimento, expressos em média \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e o $n=3-4$ camundongos por grupo.

A VitD afeta os níveis de IL-17 e IL-10 produzidos na mucosa intestinal

O percentual de DCs CD11c^HMHCII⁺ nos linfonodos mesentéricos foi levemente diminuído pelos dois tratamentos como mostrado na figura 9A. O tratamento com VitD reduziu a expressão de FOXP3 (Figura 9B) enquanto que ambos os tratamentos reduziram a expressão de IDO (Figura 9C). Os níveis de expressão de IL-10 foram similares nos linfonodos mesentéricos dos três grupos experimentais (Figura 9D). Foram observadas diferenças na permeabilidade intestinal e de produção local de citocinas por culturas de explantes intestinais. A administração de VitD ou Pari não alterou a permeabilidade intestinal de camundongos normais (dados não mostrados). Entretanto, constatamos um aumento significativo no grau de permeabilidade dos animais com EAE tratados com VitD em comparação com os não tratados ou tratados com Pari (Figura 9E). A produção de citocinas foi quantificada em sobrenadantes de culturas de explantes de jejuno. O resultado mais surpreendente foi a ausência de produção de IL-17 por explantes de animais tratados com VitD em contraste com a produção de níveis significativos desta citocina por culturas dos grupos EAE e EAE/Pari. Esta produção elevada de IL-17 foi constatada nas culturas estimuladas com ConA mas não com MOG (Figura 9F).

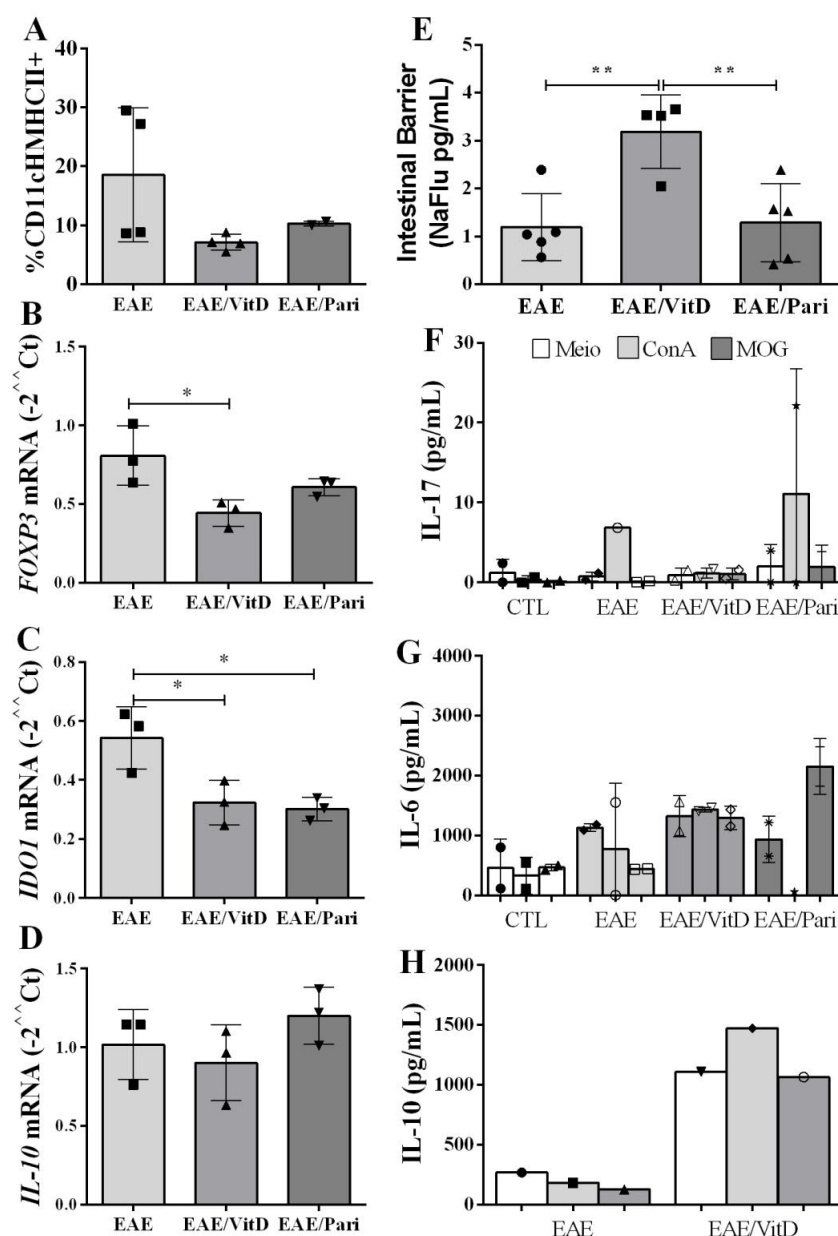


Figura 9. O tratamento com VitD afeta o perfil imunológico intestinal. Camundongos C57BL/6 foram tratados com VitD ou Pari por via i.p. a partir do 7^o dia após a indução da doença. Percentual de DCs CD11c⁺ MHC⁺ (A) e expressão de mRNA para FOXP3 (B), IDO1 (C) e IL-10 (D) foram avaliados em linfonodos mesentéricos. Permeabilidade intestinal (E) foi avaliada pelo ensaio do NaFlu. A quantificação de citocinas foi avaliada no sobrenadante de culturas de explantes de jejuno (F, G e H). Os resultados são representativos de um experimento, expressos em média ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e o n=1-4 camundongos por grupo.

Discussão

Discussão

O possível emprego da VitD como uma terapia adicional na EM derivou principalmente da constatação de baixos níveis desta vitamina nestes pacientes e das propriedades imunomoduladoras deste hormônio^{85,128}. Outras evidências tais como o fato da VitD alcançar o SNC, proteger neurônios contra a inflamação e o estresse oxidativo¹³⁹ e o estímulo à remielinização¹⁴⁰ também contribuíram para reforçar o seu potencial terapêutico. Apesar de numerosos ensaios clínicos já terem sido realizados, a possível utilização da VitD na EM continua um assunto altamente controverso^{141,142}. A experiência do nosso grupo visando controle da EAE com VitD indica que a mesma é bastante eficaz se for administrada em período próximo ao da indução da doença^{98, 122, 125}. Neste contexto, questionamos se a VitD manteria seu potencial terapêutico quando aplicada mais tardiamente no decurso da doença. O potencial terapêutico do Paricalcitol também foi avaliado pois esse análogo tem algumas propriedades imunomoduladoras e, além disto, é pouco calcêmico.

Inicialmente foi constatado que a VitD ainda era capaz de controlar o desenvolvimento da doença quando administrada no estágio pré-clínico, ou seja, sete dias após a indução da doença. Por outro lado, um efeito negligível foi observado quando o tratamento foi ministrado no início da fase clínica, ou seja, no décimo dia após indução da doença. De forma distinta, o Pari não foi capaz de prevenir nem a perda de peso corporal nem o desenvolvimento de paralisia em nenhuma destas duas fases. A partir destes dados preliminares, o trabalho foi focado em uma análise comparativa dos parâmetros imunológicos visando esclarecer os mecanismos pelos quais a VitD, mas não o Pari, estava sendo eficaz. Esta análise foi feita de acordo com a seguinte sequência: alterações encontradas em órgãos linfóides secundários, diferenças associadas com o estágio de pós-licenciamento no pulmão, indicadores de inflamação no SNC e alterações associadas com a mucosa intestinal.

A despeito da terapia com VitD ter começado no sétimo dia após indução da EAE, a mesma ainda foi capaz de modular a produção periférica de citocinas. Células de baço e de linfonodos inguinais de animais tratados com VitD produziram, respectivamente, níveis mais elevados e mais baixos do que os animais do grupo controle EAE. Tendo em mente que estas culturas foram estimuladas com MOG, conclui-se que a maioria das citocinas avaliadas foram liberadas por linfócitos T autorreativos. Considerando-se que o número de células nos linfonodos regionais estava significativamente reduzido, é possível que estas células tenham migrado para o baço, explicando desta forma, os resultados de maior produção de citocinas por culturas deste órgão. Em contraste com a VitD, os efeitos do Pari foram bem mais

discretos e caracterizados por uma tendência de produzir níveis mais baixos de IFN- γ e IL-2 nos linfonodos. A detecção de diferenças em produção de citocinas por culturas de baço e linfonodos já tem sido descrita na EAE¹⁴⁴. Esses resultados indicam de forma evidente que a VitD é um imunomodulador mais potente do que o Pari. Não é possível, entretanto, afirmar que esses efeitos contribuíram para a eficácia da VitD.

Para esclarecer estas diferenças entre VitD e Pari, comparamos a seguir seus efeitos sobre a diferenciação *in vitro* de células DCs no que se refere a marcadores fenotípicos e produção de citocinas. Considerando-se os dois tipos de parâmetros, os resultados sugerem que a presença de VitD durante a polarização das DCs determina uma polarização tolerogênica nas mesmas. Este fenômeno não foi observado na presença de Pari. O potencial tolerogênico da VitD sobre as DCs é amplamente apoiado pela literatura^{145,146}; entretanto o efeito do Pari neste processo é bastante limitado. Existem duas publicações a respeito que indicam, contrariamente aos nossos achados, que o Pari também determina polarização tolerogênica em DCs^{106,129}. Uma possível explicação para este achado se encontra na origem das células precursoras utilizadas para gerar as DCs. Diferentemente de nós que empregamos células oriundas de medula óssea de camundongos, estes autores utilizaram monócitos humanos. Pode se pensar, portanto, que o efeito do Pari seja menos pronunciado em DCs de camundongo que em células humanas.

Evidências recentes indicam que os linfócitos T precisam passar por um processo de “licenciamento” antes que possam atingir o SNC^{10,30,130}. Para investigar se o efeito diferencial da VitD e do Pari envolvia esse estágio da imunopatogênese da EAE, avaliamos vários parâmetros em células eluídas de pulmão. Estas células foram obtidas após a administração de 8 doses. Um dos achados mais interessantes foi a detecção de uma proporção significativamente elevada de células Ly6G⁺. A possibilidade de que estas células sejam polimorfonucleares supressores de origem mielóide (PMN-MDSC) é muito interessante e é, em parte, sustentada por dados da literatura. Por exemplo, Wegner et al., (2017)¹³¹ demonstraram que PMN-MDSC desempenharam um papel fundamental na geração de tolerância antígeno específica durante imunoterapia na EAE, sendo estas células são capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T CD4⁺. Também foi observado por Knier et al., (2018)¹³², que essas células supressoras controlavam o acúmulo de linfócitos B no SNC. Alternativamente, essas células poderiam ser PMN que permaneceram sequestrados no pulmão e que, portanto, não se deslocaram até o SNC. Esta possibilidade também é interessante porque os PMN fornecem no SNC condições propícias para a maturação de APCs e subsequente reestimulação local de linfócitos T específicos para mielina¹³³. Neste sentido

planejamos avaliar a presença de células supressoras monocíticas mielóides (M-MDSC) e PMN-MDSC nos pulmões e também determinar se células Ly6G⁺ estão presentes nos órgãos periféricos e no SNC dos vários grupos experimentais. A cinética destas células poderia ser distinta em períodos mais precoces da doença, entretanto a estratégia terapêutica adotada nesta investigação (8 doses em dias alternados a partir do 7^o dia), não permitiria uma abordagem mais antecipada.

Alterações adicionais foram constatadas no pulmão sugerindo um cenário celular e molecular bastante complexo neste órgão. Por exemplo, células eluídas dos pulmões desses três grupos experimentais (EAE, EAE/VitD e EAE/Pari) revelaram a mesma tendência para quase todos os parâmetros avaliados. A expressão de mRNA para RORC, FOXP3, CX3CR1, S1PR1 e CCL17 e a produção de IL-17 e IL-10 foram mais baixos nos animais tratados do que no grupo EAE. Além disso, esses valores foram mais baixos no grupo tratado com Pari do que com VitD. Ressaltamos que essas avaliações foram feitas no dia 21, ou seja, em um período considerado tardio. Segundo a literatura, este “homing” dos linfócitos TCD4⁺ nos pulmões ocorre durante a fase pré-clínica, ou seja, por volta dos dias 7-8 após a indução da EAE³³. Essa informação condiz com nosso modelo uma vez que a doença com a qual trabalhamos se manifestou clinicamente em torno do dia 10 pós-indução. Em função disso acreditamos que as células eluídas do pulmão eram, na sua maioria, linfócitos T de memória em repouso como já descrito na literatura³⁰. É possível que esta interpretação esteja correta pois detectamos baixa expressão dos fatores de transcrição e de moléculas envolvidas em tráfico celular e também baixa produção de citocinas, achados esses compatíveis com a condição de células de memória. As células de memória residentes em tecidos (T_{RM}) podem ser divididas em TCD4⁺ T_{RM} e TCD8⁺ T_{RM} e expressam baixos níveis de S1P1 e CCR7 (os quais garantem sua estadia nos tecidos periféricos). Além disso, essas células apresentam menor expressão de CD69 e CD103¹⁵² em distintos tecidos tais como pulmão, intestino e pâncreas. Curiosamente, foi demonstrado que PBMCs oriundos de pacientes com EM, tratados in vitro com VitD, sofrem depleção de células T efetoras autoimunes de memória as quais são caracterizadas pela não expressão de CCR7. Estas células efetoras expressam receptores que possibilitam migração para tecidos inflamados e são dotadas de funções efetoras imediatas^{134,135}.

As análises realizadas no SNC reforçaram os achados anteriores, indicando que a VitD realmente é dotada de maior capacidade imunomoduladora do que o Pari. Camundongos tratados com VitD apresentaram menor infiltração celular, menor expressão de MHCII na população constituída por macrófagos infiltrantes/microglia ativada e menor grau de

desmielinização. O tratamento com a vitamina desencadeou elevação da BBB no nível da medula espinal. Este resultado foi surpreendente uma vez que tínhamos observado anteriormente que o tratamento precoce com VitD (24 horas após a indução da doença) impedia o aumento da BBB observado nos animais com EAE¹²⁵. Outros achados no SNC reforçaram a maior habilidade imunomoduladora da VitD tais como os menores níveis de mRNA para NLRP3 e Caspase-1. Esses resultados são compatíveis com a contribuição essencial da ativação do inflamassoma na imunopatogênese da EAE e com a habilidade da VitD de controlar o processo de ativação desta plataforma. A relevância deste sistema é ilustrada, por exemplo, pelo desenvolvimento tardio e pela menor gravidade da doença constatada em animais *Nlrp3*^{-/-}¹³⁶. Também constatamos recentemente que ocorre redução na expressão de mRNA para vários componentes deste sistema (NLRP3, caspase-1 e IL-1 β) no SNC de animais submetidos à indução da EAE e tratados com VitD logo após a indução da doença¹²⁵. A redução observada nos níveis de mRNA para TNF- α era esperada uma vez que a presença desta citocina nas lesões ativas e sua contribuição para a imunopatogênese da EAE já estão bem estabelecidas. Este é um dos mediadores que determina a apoptose dos oligodendrócitos¹³⁷. A expressão diminuída do receptor CX3CR1 desencadeada por ambos os tratamentos também é relevante porque um dos principais papéis deste receptor é permitir o recrutamento de leucócitos para o SNC¹³⁸. A relevância da função do CX3CR1 na EAE é ilustrada pela significativa atenuação da doença quando este receptor é inibido farmacologicamente¹⁵⁸. O fato da expressão desse receptor também ter sido reduzida nos animais tratados com Pari, nos quais não ocorreu controle da doença, sugere que esta redução por si só não determina controle da doença.

A ocorrência de disfunção na barreira intestinal tem sido descrita tanto na EAE⁶⁹ quanto na MS⁷². No caso da EAE, o aumento de permeabilidade da barreira intestinal foi detectado nos dias 7 e 14 após a indução da doença e foi considerado como um fator favorecedor da progressão da doença⁶⁹. Baseados na eficácia terapêutica da VitD e no seu já descrito efeito protetor sobre a permeabilidade intestinal¹⁵⁹, prevíamos a normalização da permeabilidade intestinal nos animais tratados com esta vitamina. Diferentemente de nossa pressuposição, a permeabilidade intestinal estava inclusive mais elevada nos animais do grupo EAE/VitD do que no grupo controle EAE. A possível explicação para esse resultado é que a VitD preserva a permeabilidade normal da barreira intestinal só se for administrada quando essa barreira ainda estiver intacta; nesse caso o tratamento foi iniciado no 7^o dia após a indução da doença, ou seja, quando a barreira já estava alterada. Curiosamente, o tratamento tardio (7^o dia pós-indução), também determinou aumento da permeabilidade da BBB,

reforçando nossa hipótese de que esse hormônio não normaliza as barreiras se as mesmas já estiverem alteradas, sendo, entretanto, capaz de preservá-las se estiverem normais. Não foram encontrados trabalhos na literatura para dar suporte à nossa hipótese. Acreditamos, entretanto, que a elevada expressão de VDR no intestino¹³⁹ e a baixa afinidade do Pari por este receptor¹⁰² poderia explicar esses achados. A possível contribuição de níveis elevados de cálcio no aumento da permeabilidade intestinal tem sido investigada¹⁴⁰. Häusler e Weber (2019)¹⁴¹ em revisão sobre o possível efeito de condições hipercalcêmicas confirmaram que altas doses de VitD aumentaram os níveis de cálcio e que isto agravou a EAE. Este agravamento foi atribuído à ativação de linfócitos T associada com o influxo extracelular de cálcio.

Apesar desta permeabilidade aumentada, culturas de explantes de jejuno indicaram modulação na produção local de citocinas. Resultados preliminares mostraram que explantes do grupo EAE/Pari produziram altos níveis de IL-17 e baixos níveis de IL-10 enquanto que os explantes do grupo EAE/VitD produziram níveis irrelevantes de IL-17 associados com níveis significativos de IL-10. Esse tipo de resultado encontra respaldo na literatura. Nouri et al., (2014)⁶⁹ descreveram alterações na lâmina própria intestinal, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos caracterizadas por infiltração aumentada de células pró-inflamatórias Th1/Th17 e redução no número de Tregs durante o desenvolvimento da EAE. Os autores interpretaram estes achados como fundamentais para a alteração observada na barreira intestinal. A detecção de elevado nível de IL-10 nos animais tratados com VitD é coerente com o fato dessa citocina desempenhar acentuado efeito imunorregulador. Por exemplo, em modelo de colite espontânea, se constatou que a IL-10 inibiu a ativação do inflamassoma, tendo suprimido tanto a inflamação intestinal quanto a produção local de IL-17¹⁶³.

Em resumo, essa investigação sugere que existe uma janela de oportunidade para o tratamento da EAE, e possivelmente da EM, com VitD. Nossos resultados indicam que a VitD ainda é significativamente eficaz se a terapia for iniciada no período pré-clínico da doença. Os achados também indicam que mecanismos distintos estão contribuindo para esse efeito terapêutico, incluindo modulação da resposta imune periférica, possível mobilização de PMN-MDSC, efeitos anti-inflamatórios locais e alterações no perfil da resposta imune intestinal. Os achados também indicaram que o Pari, um análogo menos calcêmico do que a VitD, não foi capaz de controlar o desenvolvimento da doença; pelo menos quando testado em regime de administração comparável ao da VitD.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

1. Hakim, E. A. *et al.* The social impact of multiple sclerosis - a study of 305 patients and their relatives. *Disabil. Rehabil.* **22**, 288–293 (2000).
2. Goldenberg, M. M. Multiple sclerosis review. *Pharmacol. Ther.* **37**, 175–84 (2012).
3. Browne, P. *et al.* Atlas of multiple sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* **83**, 1022–1024 (2014).
4. WHO. Atlas Multiple Sclerosis resources In The World 2008. *WHO Press* 56 (2008). doi:ISBN 978 92 4 156375 8
5. Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B. & Ciccarelli, O. Multiple sclerosis. *Lancet* **391**, 1622–1636 (2018).
6. Gelfand, J. M. *Multiple sclerosis: Diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. Handbook of Clinical Neurology* **122**, (Elsevier B.V., 2014).
7. Matute-Blanch, C., Montalban, X. & Comabella, M. *Multiple sclerosis, and other demyelinating and autoimmune inflammatory diseases of the central nervous system. Handbook of Clinical Neurology* **146**, (Elsevier B.V., 2017).
8. Filippi, M., Rocca, M. A., Ciccarelli, O., De Stefano, N., Evangelou, N., Kappos, L., Rovira, A., Sastre-Garriga, J., Tintorè, M., Frederiksen, J. L., Gasperini, C., Palace, J., Reich, D. S., Banwell, B., Montalban, X., Barkhof, F. MRI CRITERIA FOR THE DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS: MAGNIMS CONSENSUS GUIDELINES. *Lancet Neurol.* **15**, 292–303 (2016).
9. Baecher-allan, C., Kaskow, B. J. & Weiner, H. L. Review Multiple Sclerosis : Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* **97**, 742–768 (2018).
10. Olsson, T., Barcellos, L. F. & Alfredsson, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 26–36 (2016).
11. Ascherio, A., Munger, K. L. & Lünemann, J. D. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 602–612 (2012).
12. Schmidt, H., Williamson, D. & Ashley-Koch, A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: A HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* **165**, 1097–1109 (2007).
13. Oksenberg, J. A. H. and J. R. The Immunogenetics of Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. **64**, 13–25 (2015).
14. Plavina, T. *et al.* Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.* **76**, 802–812 (2014).
15. Handel, A. E. *et al.* An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* **5**, 1–5 (2010).
16. Steelman, A. J. Infection as an environmental trigger of multiple sclerosis disease exacerbation. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
17. Geginat, J. *et al.* The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis: Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance? *Trends Immunol.* **38**, 498–512 (2017).
18. Van Der Mei, I. A. F. *et al.* Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: Case-control study. *Bmj* **327**, 316 (2003).
19. Pierrot-Deseilligny, C. & Souberbielle, J. C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **14**, 35–45 (2017).
20. Lassmann, H. & Bradl, M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* **133**, (2017).
21. Bjelobaba, I., Begovic-Kupresanin, V., Pekovic, S. & Lavrnja, I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **96**, 1021–1042 (2018).
22. Fraga-Silva, T. F. C. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis development is aggravated by *Candida albicans* infection. *J. Immunol. Res.* **2015**, (2015).
23. Steinman, L. & Zamvil, S. S. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to

- research on multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **60**, 12–21 (2006).
24. Hemmer, B., Kerschensteiner, M. & Korn, T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **14**, 406–419 (2015).
 25. Kawachi, I. & Lassmann, H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **88**, 137–145 (2017).
 26. Dendrou, C. A., Fugger, L. & Friese, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, (2015).
 27. Hartung, H. P., Aktas, O., Menge, T. & Kieseier, B. C. *Immune regulation of multiple sclerosis. Handbook of Clinical Neurology* **122**, (Elsevier B.V., 2014).
 28. Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E. & Wekerle, H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *Lancet Neurol.* **15**, 317–331 (2016).
 29. Martin, R. *et al.* Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat. Med.* **6**, 1167–1175 (2000).
 30. Odoardi, F. *et al.* T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature* **488**, 675–679 (2012).
 31. Cuiyan Tan, Wambui S. Wandu, R. Steven Lee, Samuel H. Hinshaw, Dennis M. Klinman, E. W. and I. G. SHEDDING NEW LIGHT ON THE PROCESS OF “LICENSING” FOR PATHOGENICITY BY Th-LYMPHOCYTES. *Nature* **198**, 681–690 (2017).
 32. Schläger, C. *et al.* Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid. *Nature* **530**, 349–353 (2016).
 33. Kanayama, M., Danzaki, K., He, Y. W. & Shinohara, M. L. Lung inflammation stalls Th17-cell migration en route to the central nervous system during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.* **28**, 463–469 (2016).
 34. Ortiz, G. G. *et al.* Role of the Blood-Brain Barrier in Multiple Sclerosis. *Arch. Med. Res.* **45**, 687–697 (2014).
 35. Minagar, A. & Alexander, J. S. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **9**, 540–549 (2003).
 36. Kebir, H. *et al.* Human T H 17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and CNS inflammation. *Nat. Med.* **13**, 1173–1175 (2007).
 37. Fischer, A. J., Zelinka, C. & Milani-Nejad, N. Reactive retinal microglia, neuronal survival, and the formation of retinal folds and detachments. *Glia* **63**, 313–327 (2015).
 38. Lucchinetti, C. F. *et al.* Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Ann. Neurol.* **47**, 707–717 (2000).
 39. Ramesh, B. & Pugalendi, K. V. Impact of umbelliferone on erythrocyte redox status in STZ-diabetic rats. *Yale J. Biol. Med.* **78**, 131–138 (2005).
 40. Haider, L. *et al.* Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* **134**, 1914–1924 (2011).
 41. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
 42. Miao, E. A., Rajan, J. V. & Aderem, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* **243**, 206–214 (2011).
 43. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
 44. Jounai, N., Kobiyama, K., Takeshita, F. & Ishii, K. J. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–13 (2013).
 45. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* **140**, 821–832 (2010).
 46. Haitao Wen, Jenny P-Y. Ting, and L. A. J. O. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases and did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol.* **13**, 352–357 (2014).
 47. Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by IL-1 signaling. *Immunity* **30**, 576–587

- (2010).
48. Nakanishi, K., Yoshimoto, T. & Okamura, H. INTERLEUKIN -18 REGULATES BOTH TH1 AND TH2 RESPONSES. 14–16 (2001).
 49. Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G. & 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**, 1685–1691 (2006).
 50. Ming, X. *et al.* Caspase-1 expression in multiple sclerosis plaques and cultured glial cells. *J. Neurol. Sci.* **197**, 9–18 (2002).
 51. Babbe, H. *et al.* Clonal Expansions of Cd8⁺ T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction. *J. Exp. Med.* **192**, 393–404 (2000).
 52. Frischer, J. M. *et al.* The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* **132**, 1175–1189 (2009).
 53. Skulina, C. *et al.* Multiple sclerosis : Brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. **101**, (2004).
 54. Salou, M. *et al.* Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. (2015). doi:10.1002/acn3.199
 55. Höftberger, R. *et al.* Expression of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on the Different Cell Types in Multiple Sclerosis Lesions. *Brain Pathol.* **14**, 43–50 (2004).
 56. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, B. W. Acute axonal injury in multiple sclerosis: Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* **123**, 1174–1183 (2000).
 57. Tzartos, J. S. *et al.* Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* **172**, 146–155 (2008).
 58. Brucklacher-waldert, V., Stürner, K., Kolster, M., Wolthausen, J. & Tolosa, E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. (2009). doi:10.1093/brain/awp289
 59. Luchtman, D. W., Ellwardt, E., Larochelle, C. & Zipp, F. Cytokine & Growth Factor Reviews IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis : Current and future developments. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 403–413 (2014).
 60. Staun-ram, E. & Miller, A. Effector and regulatory B cells in Multiple Sclerosis. *Clin. Immunol.* **184**, 11–25 (2017).
 61. Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E. & Aloisi, F. Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. 164–174
 62. Meinel, E., Krumbholz, M. & Hohlfeld, R. NEUROLOGICAL PROGRESS B Lineage Cells in the Inflammatory Central Nervous System Environment : Migration , Maintenance , Local Antibody Production , and Therapeutic Modulation. 880–892 (2006). doi:10.1002/ana.20890
 63. Rodríguez-pinto, D. B cells as antigen presenting cells. **238**, 67–75 (2006).
 64. Piancone, F. *et al.* B Lymphocytes in Multiple Sclerosis : Bregs and BTLA / CD272 Expressing-CD19⁺ Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Nat. Publ. Gr.* 1–11 (2016). doi:10.1038/srep29699
 65. Danikowski, K. M., Jayaraman, S. & Prabhakar, B. S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. 13–17 (2017). doi:10.1186/s12974-017-0892-8
 66. Buc, M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* **2013**, (2013).
 67. Sushmita Sinha, Farah R. Itani, and N. J. K. Immune Regulation of Multiple Sclerosis by CD8⁺ T cells Sushmita. *Immunol. Res.* **59**, 254–265 (2014).
 68. Chu, F. *et al.* The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **318**, 1–7 (2018).

69. Nouri, M., Bredberg, A., Weström, B. & Lavasani, S. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS One* **9**, (2014).
70. Secher, T. *et al.* Oral administration of the probiotic strain Escherichia coli Nissle 1917 reduces susceptibility to neuroinflammation and repairs experimental autoimmune encephalomyelitis-induced intestinal barrier dysfunction. *Front. Immunol.* **8**, 1–10 (2017).
71. Cosorich, I. *et al.* High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci. Adv.* **3**, 1–9 (2017).
72. Camara-Lemarroy, C. R., Metz, L., Meddings, J. B., Sharkey, K. A. & Wee Yong, V. The intestinal barrier in multiple sclerosis: Implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain* **141**, 1900–1916 (2018).
73. 't Hart BA, Gran B, W. R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. 119–125 (2011). doi:10.1016/j.molmed.2010.11.006.
74. van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F, Miller DH, Moseley IF, Thompson SJ, Rudge P, McDougall A, McLeod JG, Adér HJ, P. C. Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* **49**, 351–357 (1997).
75. Singer, B. A. Parenteral Treatment of Multiple Sclerosis: The Advent of Monoclonal Antibodies. *Semin. Neurol.* **36**, 140–147 (2016).
76. Gold, R. & Wolinsky, J. S. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol. Scand.* **124**, 75–84 (2011).
77. Yong, V. W. Differential mechanisms of action of interferon- β and glatiramer acetate in MS. *Neurology* **59**, 802–808 (2002).
78. Chris H. Polman, Paul W. O'Connor, Eva Havrdova, Michael Hutchinson, Ludwig Kappos, David H. Miller, J. Theodore Phillips, Fred D. Lublin, M.D., Gavin Giovannoni, M.D., Andrzej Wajgt, M.D., Martin Toal, M.F.P.M., Frances Lynn, Michael A. Panzara, and Alfr, and A. W. S. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **357**, 741–752 (2007).
79. Aktas, O., Küry, P., Kieseier, B. & Hartung, H.-P. Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 373–382 (2010).
80. Slowik, A. *et al.* The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 is neuroprotective after cuprizone-induced CNS demyelination. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 80–92 (2015).
81. Rommer, P. S. & Zettl, U. K. Managing the side effects of multiple sclerosis therapy : pharmacotherapy options for patients. *Expert Opin. Pharmacother.* **00**, 1–16 (2018).
82. Eyles, D. W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M. & McGrath, J. J. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J. Chem. Neuroanat.* **29**, 21–30 (2005).
83. Kongsbak, M., Levring, T. B., Geisler, C. & von Essen, M. R. The vitamin D receptor and T cell function. *Front. Immunol.* **4**, 1–10 (2013).
84. Wöbke, T. K., Sorg, B. L. & Steinhilber, D. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front. Physiol.* **5 JUL**, 1–20 (2014).
85. Sassi, F., Tamone, C. & D'amelio, P. Vitamin D: Nutrient, hormone, and immunomodulator. *Nutrients* **10**, 1–14 (2018).
86. Micinski, S. K. J. and D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **437**, 7–11 (2013).
87. Neve, A., Corrado, A. & Cantatore, F. P. Immunomodulatory effects of vitamin D in peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Med.* **14**, 275–283 (2014).

88. Boontanrart, M., Hall, S. D., Spanier, J. A., Hayes, C. E. & Olson, J. K. Vitamin D3 alters microglia immune activation by an IL-10 dependent SOCS3 mechanism. *J. Neuroimmunol.* **292**, 126–136 (2016).
89. Penna, G. & Adorini, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. *J. Immunol.* **164**, 2405–2411 (2000).
90. Adorini, L., Giarratana, N. & Penna, G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **16**, 127–134 (2004).
91. Penna, G. *et al.* Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* **106**, 3490–3497 (2005).
92. Zoë Urry¹, Emma S. Chambers^{*}, 1, Emmanuel Xystrakis^{*}, 1, Sarah Dimeloe¹, David F. Richards¹, Leona Gabryšová², Jillian Christensen², Atul Gupta^{1, 3}, Sejal Saglani³, A. & Bush, Anne O'Garra, Zarin Brown, and C. M. H. The role of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines in the promotion of distinct Foxp3+ and IL-10+ CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2697–2708 (2012).
93. Staeva-Vieira, T. P. & Freedman, L. P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits IFN- and IL-4 Levels During In Vitro Polarization of Primary Murine CD4+ T Cells. *J. Immunol.* **168**, 1181–1189 (2002).
94. Boonstra, A. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4+ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *J. Immunol.* **167**, 4974–4980 (2001).
95. Sigmundsdottir, H. *et al.* DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat. Immunol.* **8**, 285–293 (2007).
96. Chen, J., Bruce, D. & Cantorna, M. T. Vitamin D receptor expression controls proliferation of naïve CD8+ T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal inflammation. *BMC Immunol.* **15**, 1–11 (2014).
97. Hamzaoui, A. *et al.* Vitamin D reduces the differentiation and expansion of Th17 cells in young asthmatic children. *Immunobiology* **219**, 873–879 (2014).
98. Heine, G. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promotes IL-10 production in human B cells. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2210–2218 (2008).
99. Drozdenko, G., Scheel, T., Heine, G., Baumgrass, R. & Worm, M. Impaired T cell activation and cytokine production by calcitriol-primed human B cells. *Clin. Exp. Immunol.* **178**, 364–372 (2014).
100. Tebben, P. J., Singh, R. J. & Kumar, R. Vitamin D-mediated hypercalcemia: Mechanisms, diagnosis, and treatment. *Endocr. Rev.* **37**, 521–547 (2016).
101. Brown, A. J. & Slatopolsky, E. Vitamin D analogs: Therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Mol. Aspects Med.* **29**, 433–452 (2008).
102. Nakane, M., Ma, J., Rose, A. E., Osinski, M. A. & Wu-Wong, J. R. Differential effects of Vitamin D analogs on calcium transport. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **103**, 84–89 (2007).
103. Holliday, L. S., Gluck, S. L., Slatopolsky, E. & Brown, a J. 1,25-Dihydroxy-19-nor-vitamin D(2), a vitamin D analog with reduced bone resorbing activity in vitro. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1857–64 (2000).
104. Brancaccio, D., Bommer, J. & Coyne, D. Vitamin D Receptor Activator Selectivity in the Treatment of Secondary Hyperparathyroidism. *Drugs* **67**, 1981–1998 (2007).
105. Meehan, T. F., Vanhooke, J., Prael, J. & DeLuca, H. F. Hypercalcemia produced by parathyroid hormone suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in female but not male mice. *Arch. Biochem. Biophys.* **442**, 214–221 (2005).
106. Sochorová, K. *et al.* Paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) exert potent immunomodulatory effects on dendritic cells and inhibit induction of antigen-specific T cells. *Clin. Immunol.* **133**, 69–77 (2009).
107. Duffy, M. M. *et al.* Mesenchymal stem cells and a vitamin D receptor agonist additively suppress T helper 17 cells and the related inflammatory response in the kidney. *Am. J. Physiol. Physiol.* **307**, F1412–F1426 (2014).
108. Tan, X., Wen, X. & Liu, Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated

- sequestration of NF-kappaB signaling. *J Am Soc Nephrol* **19**, 1741–1752 (2008).
109. Lucisano, S. *et al.* Role of Paricalcitol in Modulating the Immune Response in Patients with Renal Disease. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, (2015).
 110. Alagbala, A. A., Johnson, C. S., Trump, D. L., Posner, G. H. & Foster, B. A. Antitumor effects of two less-calcemic vitamin D analogs (paricalcitol and QW-1624F2-2) in squamous cell carcinoma cells. *Oncology* **70**, 483–492 (2007).
 111. Bäärnhielm, M., Olsson, T. & Alfredsson, L. Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **20**, 726–732 (2014).
 112. Brum, D. G., Comini-Frota, E. R., Vasconcelos, C. C. F. & Dias-Tosta, E. Suplementação e uso terapêutico de vitamina D nos pacientes com esclerose múltipla: Consenso do Departamento Científico de Neuroimunologia da Academia Brasileira de Neurologia. *Arq. Neuropsiquiatr.* **72**, 152–156 (2014).
 113. Mosayebi, G., Ghazavi, A., Ghasami, K., Jand, Y. & Kokhaei, P. Therapeutic effect of vitamin D3 in multiple sclerosis patients. *Immunol. Invest.* **40**, 627–639 (2011).
 114. da Costa, D. S. M. M. *et al.* Vitamin D modulates different IL-17-secreting T cell subsets in multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* **299**, 8–18 (2016).
 115. Sotirchos, E. S. *et al.* Safety and immunologic effects of high- vs low-dose cholecalciferol in multiple sclerosis. *Coast, J.* (1997). The case against. *Bmj.* <http://doi.org/10.1136/bmj.314.7087.1118> *Coast, J.* (1997). The case against. *Bmj.* <http://doi.org/10.1136/bmj.314.7087.1118>. *Neurology* **86**, 382–90 (2016).
 116. Xie, Z. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. *Immunology* **152**, 414–424 (2017).
 117. Chiuseo-Minicucci, F. *et al.* Treatment with vitamin D/MOG association suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* **10**, (2015).
 118. Mimura, L. A. N. *et al.* Association of myelin peptide with vitamin D prevents autoimmune encephalomyelitis development. *Neuroscience* **317**, (2016).
 119. Shirazi, H. A. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis through both immunomodulation and oligodendrocyte maturation. *Exp. Mol. Pathol.* **102**, 515–521 (2017).
 120. Zorzella-Pezavento, S. F. G. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis is successfully controlled by epicutaneous administration of MOG plus vitamin D analog. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 121. Egido, J. *et al.* The pleiotropic effects of paricalcitol: Beyond bone-mineral metabolism. *Nefrologia* **36**, 10–18 (2016).
 122. Kim, T. H. & Ji, J. D. Paricalcitol, a synthetic vitamin D analog: A candidate for combination therapy with biological agents in rheumatoid arthritis. *Med. Hypotheses* **75**, 634–635 (2010).
 123. González-Mateo, G. T. *et al.* Paricalcitol reduces peritoneal fibrosis in mice through the activation of regulatory T cells and reduction in IL-17 production. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
 124. Pacini, S. *et al.* Effects of vitamin D3 and paricalcitol on immature cardiomyocytes: A novel role for vitamin D analogs in the prevention of cardiovascular diseases. *Nutrients* **5**, 2076–2092 (2013).
 125. Oliveira, L. R. C. Controle da ativação do inflamassoma e do estresse oxidativo pela vitamina D na encefalomielite autoimune experimental (EAE). (2018).
 126. Bareiss, P. M. *et al.* Organotypical tissue cultures from adult murine colon as an in vitro model of intestinal mucosa. *Histochem Cell Biol* **129**, 795–804 (2008).
 127. Randall, K. J., Turton, J. & Foster, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: A review of methods and applications. *Cell Biol. Toxicol.* **27**, 267–284 (2011).
 128. Sintzel, M. B., Rametta, M. & Reder, A. T. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol. Ther.* **7**, 59–85 (2017).

129. Dáňová, K. *et al.* NF- κ B, p38 MAPK, ERK1/2, mTOR, STAT3 and increased glycolysis regulate stability of paricalcitol/dexamethasone-generated tolerogenic dendritic cells in the inflammatory environment. *Oncotarget* **6**, 14123–14138 (2015).
130. Glenn, J. D. *et al.* CNS-targeted autoimmunity leads to increased influenza mortality in mice. *J. Exp. Med.* **214**, 297–307 (2017).
131. Wegner, A., Verhagen, J. & Wraith, D. C. Myeloid-derived suppressor cells mediate tolerance induction in autoimmune disease. *Immunology* **151**, 26–42 (2017).
132. Knier, B. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells control B cell accumulation in the central nervous system during autoimmunity. *Nat. Immunol.* **19**, 1341–1351 (2018).
133. Steinbach, K., Piedavent, M., Bauer, S., Neumann, J. T. & Friese, M. A. Neutrophils Amplify Autoimmune Central Nervous System Infiltrates by Maturing Local APCs. *J. Immunol.* **191**, 4531–4539 (2013).
134. Bhargava, P., Gocke, A. & Calabresi, P. A. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ impairs the differentiation of effector memory T cells in vitro in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J. Neuroimmunol.* **279**, 20–24 (2015).
135. Federica Sallusto, Danielle Lenig, Reinhold Förster, M. L. & A. L. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **2**, 708–712 (1999).
136. Denis Gris, Zhengmao Ye, Heather A. Iocca, Haitao Wen, Robin R. Craven, Pavel Gris, Max Huang, Monika Schneider, Stephen D. Miller, and J. P.-Y. & Ting. NLRP3 Plays a Critical Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Mediating Th1 and Th17 Responses. *J Immunol* **40**, 1301–1315 (2012).
137. Kaltsonoudis, E. *et al.* Neurological adverse events in patients receiving anti-TNF therapy: A prospective imaging and electrophysiological study. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 1–7 (2014).
138. Blauth, K., Zhang, X., Chopra, M., Rogan, S. & Markovic-Plese, S. The role of fractalkine (CX3CL1) in regulation of CD4⁺ cell migration to the central nervous system in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **157**, 121–132 (2015).
139. Christakos, S., Dhawan, P., Porta, A., Mady, L. J. & Seth, T. Vitamin D and Intestinal Calcium Absorption. *Mol. Cell. Endocrinol.* **347**, 25–29 (2011).
140. Elamin, E. *et al.* Ethanol impairs intestinal barrier function in humans through mitogen activated protein kinase signaling: A combined in vivo and in vitro approach. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).
141. Häusler, D. & Weber, M. Vitamin D Supplementation in Central Nervous System Demyelinating Disease—Enough Is Enough. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 218 (2019).
- * Fleming, J.O.; Hummel, A.L.; Beinlich, B.R.; Borowski, B.J.; Peebles, T.; Colburn, M.; Cook, T.D.; Wendt, G. J.; DeLuca, H. F. *Neurology*, 2000, 54(Suppl. 3), A338).

Apêndices

Apêndice I : Coautoria em publicações durante o período do doutorado (2015-2019)

- 1) Mimura, LAN; Chiuso-Minicucci, F; Fraga-Silva, TFC; Zorzella-Pezavento, SFG; França, TGD; Ishikawa, LLW; Pententi, M; Ikoma, MRV; Sartori, A. Association of myelin peptide with vitamin D prevents autoimmune encephalomyelitis development. *Neuroscience*, v.317, p.130-140, 2016. doi: 10.1016/j.neuroscience. 2015.12.053.
- 2) Fraga-Silva, TFC; Mimura, LA; Marchetti, CM; Chiuso-Minicucci, F; França, TG; Zorzella-Pezavento, SF; Venturini, J; Arruda, MS; Sartori, A. Experimental autoimmune encephalomyelitis development is aggravated by *Candida albicans* infection. *J Immunol Res*. 2015;2015:635052. doi: 10.1155/2015/635052. Epub 2015 Apr 19.
- 3) Ishikawa, LLW; Colavite, PM; Fraga-Silva, TFC; Mimura, LAN; França, TGD; Zorzella-Pezavento, SFG; Chiuso-Minicucci, F; Marcolino, LD; Penitenti, M; Ikoma, MRV; Sartori, A. Vitamin D Deficiency and Rheumatoid Arthritis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2016. doi: 10.1007/s12016-016-8577-0.
- 4) Venturini, J; Fraga-Silva, TFC; Marchetti, CM; Mimura, LAN; Conti, BJ; Golim, MA; Mendes, RP; Arruda, MSP. Imbalanced Macrophage and Dendritic Cell Activations in Response to *Candida albicans* in a Murine Model of Diabetes Mellitus. *Immunological Investigations*, v.45, p.420-438, 2016.
- 5) Ishikawa, LLW; Colavite, PM; Fraga-Silva, TFC; Mimura, LAN ; FRANÇA, T.G.D.; Zorzella-Pezavento, SFG ; Chiuso-Minicucci, F; Marcolino, LD; Marques, C; Ikoma, MRV; Sartori, A. Systemic Administration of Proteoglycan Protects BALB/c Retired Breeder Mice from Experimental Arthritis. *J Immunol Res* , v. 2016, p. 1-1 , 2016.
- 6) Fraga-Silva, TFC; Mimura, LAN; Zorzella-Pezavento, SFG; Ishikawa, LLW; França, TGD; Thomé, R; Verinaud, L; Arruda, MSP; Sartori, A. Tolerogenic Vaccination with MOG/VitD Overcomes Aggravating Effect of *C. albicans* in Experimental Encephalomyelitis. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 22, p. 807-816, 2016.
- 7) Zorzella-Pezavento SFG; Mimura LAN; Fraga-Silva TFC; Ishikawa, LLW; França TGD; Sartori A. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Is Successfully Controlled by Epicutaneous Administration of MOG Plus Vitamin D Analog. *Front Immunol*. 2017 Oct 16;8:1198. doi: 10.3389/fimmu.2017.01198.
- 8) Ishikawa LLW; Colavite PM; Fraga-Silva TFC; Mimura, LAN; França TGD; Zorzella-Pezavento SFG; Chiuso-Minicucci F; Marcolino LD; Penitenti M; Ikoma MRV; Sartori A. Vitamin D Deficiency and Rheumatoid Arthritis.. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017 Jun; 52(3):373-388. doi: 10.1007/s12016-016-8577-0.
- 9) Missio, AP; Fraga-Silva, TFC; Ishikawa, LLW; Mimura, LAN; França, TGD; de Oliveira, LRC; Sartori, A; Zorzella-Pezavento, SFG. C57BL/6 and DBA/1 Mice Differ in Their Response to Supplementation with 1,25D and Paricalcitol. *Biomed Environ Sci*. 2018 Aug;31(8):613-618. doi: 10.3967/bes2018.083.
- 10) Sanches, MD; Mimura, LAN; Oliveira, LRC; Ishikawa, LLW; Garces, HG; Bagagli, E; Sartori, A; Kurokawa, CS; Fraga-Silva,TFC. Differential Behavior of Non-albicans *Candida* Species in the Central Nervous System of Immunocompetent and Immunosuppressed Mice.*Front Microbiol*. 2019 Jan 8;9:2968. doi: 10.3389/fmicb.2018.02968.

Apêndice II: Certificado do comitê de ética- CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ribeirão Preto



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Vitamina D, paricalcitol, glibenclamida e clofazimina: potencial terapêutico e efeitos imunomoduladores na encefalomielite autoimune experimental", Protocolo nº 1099-CEUA, sob a responsabilidade de **Alexandrina Sartori**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 25/6/2018	Término: 3/3/2019
Espécie/Inoculação:	Camundongo SJJ e C57Bl/6	
Nº de animais:	300	
Peso:	18-20g	Idade: 7 semanas
Sexo:	Fêmeas	
Origem:	Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP Ribeirão Preto/SP - CNPJ: 6302530002662	

Bouquara, 15 de junho de 2018.

Prof. Dr. **Bruno Cesar Schimring**
Coordenador da CEUA



Instituto de Zoonozias - Unidade Terceira Avenida
Esplanada do Jd. São João nº 1 - CEP: 13069-900 - Ribeirão Preto/SP
Tel: 11 3669-0051 Fax: 11 3669-1766 e-mail: comit@ibg.unesp.br