

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/10/2023.



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

WILLIAM DANILO FERNANDES DE SOUZA

**USO DO SARS-CoV-2 INATIVADO PARA ESTUDOS
PRÉ-CLÍNICOS DE INFLAMAÇÃO PULMONAR E DE
EFEITO NA ENCEFALOMIELE ENCEFALOMIELE
EXPERIMENTAL**

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

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

**Botucatu
Outubro/2022**

William Danilo Fernandes de Souza

USO DO SARS-CoV-2 INATIVADO PARA
ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE INFLAMAÇÃO
PULMONAR E DE EFEITO NA
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL

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

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

Botucatu
Outubro/2022

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Souza, William Danilo Fernandes de.

Uso do SARS-CoV-2 inativado para estudos pré-clínicos de inflamação pulmonar e de efeito na encefalomielite autoimune experimental / William Danilo Fernandes de Souza. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Alexandrina Sartori
Coorientador: Sofia Fernanda Gonçalves
Zorzella-Pezavento
Capes: 21104000

1. Encefalomielite autoimune experimental. 2. Pulmões - Doenças. 3. Resposta imune. 4. COVID-19 (Doença).
5. Pneumonia.

Palavras-chave: C57BL/6; Inflamação; Pulmão; Resposta imune; SARS-CoV-2.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo auxílio e apoio em todos os momentos e por acreditar e apoiar todas as minhas escolhas. Agradeço em especial as mulheres da minha vida, minha mãe e minha avó, que sempre me deram o amor necessário para continuar acreditando que a vida é linda e vai muito além de qualquer dificuldade que, por eventualidade, nos confronte em nossa jornada.

Ao meu vovô, que mesmo sem entender nada do que eu executava em laboratório, sempre fazia questão de perguntar como as coisas estavam indo no “trabalho”. Ele se foi no ano passado, mas sei que ele estaria orgulhoso pela minha eventual obtenção de título, não que isso significasse algo para ele, mas eu sei que ele estaria feliz pelo simples fato de seu neto estar feliz.

Ao meu namorado que sempre esteve ao meu lado sem julgar meus momentos de estresse e que sempre me incentivou e torceu pelas minhas conquistas.

A minha orientadora Profa. Dra. Alexandrina Sartori, por me acolher em seu laboratório. Agradeço pela oportunidade, paciência, ensinamentos, dedicação e confiança. Hoje ela encerra sua brilhante carreira na pesquisa e eu tenho a honra de fazer parte da sua história, espero fazer jus ao seu nome ao longo da minha jornada. Passamos juntos por um momento caótico, a Pandemia COVID-19, e isso dificultou muito nosso trabalho, mas juntos vencemos o desafio. Devo tudo ao seu comprometimento e dedicação.

A minha coorientadora Profa. Dra. Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento pela maestria e leveza que conduziu nosso projeto. Devo a ela todo o conhecimento adquirido ao longo desses anos. Além de ser uma excelente profissional, sempre teve a delicadeza de ser um ombro amigo nas horas difíceis.

A Profa. Dra. Denise Moraes da Fonseca pela receptividade em seu laboratório e entusiasmo em nosso trabalho, sua colaboração intelectual e

prática é imensurável, e é por isso que hoje podemos apresentar sua conclusão. Agradeço também a todos os seus alunos, em especial a Marina e Caio, que me auxiliaram com perfeição na execução de técnicas que eu pouco compreendia no início dessa jornada.

Ao professor Dr. José Luiz Proença-Módena e colaboradores pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

Ao professor Dr. João Pessoa Araújo Jr. que confiou em nosso trabalho e aceitou ser o responsável pelo projeto, o que nos permitiu dar o início aos experimentos e concluir nosso estudo.

A Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira, que nos permitiu utilizar os equipamentos do laboratório de patologia.

A coordenação e administração da pós-graduação em Doenças Tropicais, Empresa JBS, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

E por último, mas não menos importante, aos animais que utilizamos ao longo desse projeto. Agradeço por suas vidas em prol da ciência, no decorrer de cada experimento me comprometi a lhes oferecer o máximo de respeito e cuidado como tentativa de retribuir qualquer desconforto que tenhamos lhes causado.

A Deus sobre todas as coisas.

“Quando a vida parece difícil, os corajosos não se deitam e aceitam a derrota; em vez disso, estão ainda mais determinados a lutar por um futuro melhor.”

- Rainha Elizabeth II

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 que se disseminou para a maioria dos países constituindo uma pandemia. O principal órgão-alvo dessa doença costuma ser o pulmão cujo comprometimento varia de leve a grave. Parte significativa do envolvimento pulmonar tem sido atribuída a um processo inflamatório exacerbado envolvendo tanto a imunidade inata quanto a específica. Na primeira fase desta investigação caracterizamos um modelo de inflamação pulmonar desencadeado pela inoculação intranasal do SARS-CoV-2 inativado em camundongos e avaliamos a capacidade da vitamina D de controlar ou modificar este processo. A instilação nasal de SARS-CoV2 desencadeou um processo inflamatório associado com diferentes tipos celulares e mediadores o qual foi controlado pela administração nasal de vitD. Na segunda fase desta investigação utilizamos o SARS-CoV-2 inativado como uma preparação vacinal para analisar seu efeito na evolução clínica e imunológica da encefalomielite autoimune experimental (EAE) que é o modelo mais utilizado para estudos de esclerose múltipla. Para isto, camundongos C57BL/6 foram, inicialmente, imunizados com o vírus inativado associado ao alúmen e avaliados quanto à indução da resposta imune humoral e celular específicas. Posteriormente, animais assim imunizados foram submetidos à indução da EAE por imunização com MOG na presença de Adjuvante Completo de Freund e toxina pertussis. Até o momento foram avaliados variação de peso corporal e escores clínicos. A imunização com o vírus inativado não agravou o desenvolvimento da EAE.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, encefalomielite autoimune experimental, C57BL/6, esclerose múltipla, inflamação, resposta imune, vacinação, pulmão, sistema nervoso central.

ABSTRACT

COVID-19 is an ongoing pandemic triggered by the coronavirus SARS-CoV-2. The main targets of this infectious disease are the lungs and a significant part of its involvement is associated to an accentuated inflammatory process involving innate and specific immunity. Initially, we established and characterized a pulmonary inflammatory process triggered by intranasal instillation of inactivated SARS-CoV-2 in C57BL/6 mice and then evaluated the ability of vitamin D to control or modify this process. Intranasal instillation of inactivated SARS-CoV-2 triggered an inflammatory process constituted of various cells and mediators which was significantly controlled by intranasal vitD administration. We then employed the inactivated SARS-CoV-2 as a vaccine antigen to analyze its effect on the clinical and immunological evolution of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) which is the most used animal model for multiple sclerosis studies. C57BL/6 mice were then immunized with the virus associated to alúmen to characterize the humoral and cellular specific immune responses. Similarly immunized mice were then submitted to EAE induction by inoculation of MOG emulsified with Complete Freund Adjuvant in the presence of pertussis toxin. The following parameters were evaluated up to now: body weight variation and clinical scores. Immunization with the inactivated SARS-CoV-2 did not aggravate EAE development.

Keywords: SARS-CoV-2, experimental autoimmune encephalomyelitis, C57BL/6, multiple sclerosis, inflammation, immune response, vaccination, lung, central nervous system.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1..... | 10 |
| 1 REVISÃO DE LITERATURA..... | 11 |
| 1.1 COVID-19: aspectos epidemiológicos, agente etiológico e formas clínicas | 11 |
| 1.2 Resposta imune, “cytokine storm” e patogênese pulmonar..... | 15 |
| 1.3 Esclerose múltipla: modelo experimental, imunopatogênese e fatores ambientais | 17 |
| 1.4 Esclerose múltipla & COVID-19 & vacinação..... | 22 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 26 |
| 3 OBJETIVOS | 27 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |
| CAPÍTULO 2..... | 35 |
| ARTIGO SUBMETIDO À FRONTIERS IN PHARMACOLOGY EM 22.09.2022..... | 36 |
| REFERENCES..... | 71 |
| CAPÍTULO 3..... | 77 |
| COVID-19 & MULTIPLE SCLEROSIS RELATIONSHIP: A TWO-WAY ROAD | 78 |
| 1.Introduction..... | 79 |
| 2.COVID-19: clinical manifestations, etiology, and immunopathogenesis..... | 79 |
| 3.Neurological involvement associated to COVID-19..... | 82 |
| 4.Connection between Covid-19 and autoimmunity | 84 |
| 5.Connection between COVID-19 and vitamin D | 86 |
| 6. Multiple Sclerosis: clinical manifestations and immunopathogenesis | 89 |
| 7.Connection between MS and virus (EBV and SARS-CoV-2) | 93 |
| 8.Connection between multiple sclerosis and vitamin D..... | 97 |
| 9.Experimental animal models to decipher the complex COVID-19 & MS interplay | 104 |

| | |
|--|------------|
| 10. Conclusion..... | 108 |
| REFERENCES..... | 109 |
| MATERIAL COMPLEMENTAR | 122 |
| EFEITO DA IMUNIZAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA EAE | 123 |
| SUPPLEMENTARY FIGURE 1: GENERAL EXPERIMENTAL DESIGN | 125 |
| SUPPLEMENTARY FIGURE 2: GATE STRATEGY AND T-SNE ANALYSIS OF CELLS ISOLATED FROM THE LUNG TISSUE OF MICE | 126 |
| SUPPLEMENTARY FIGURE 3: GATE STRATEGY FOR CYTOKINE DETECTION BY FLOW CYTOMETRY | 128 |
| SUPPLEMENTARY FIGURE 4: GATE STRATEGY FOR CYTOKINE DETECTION BY FLOW CYTOMETRY | 129 |

CAPÍTULO 1

1 Revisão de literatura

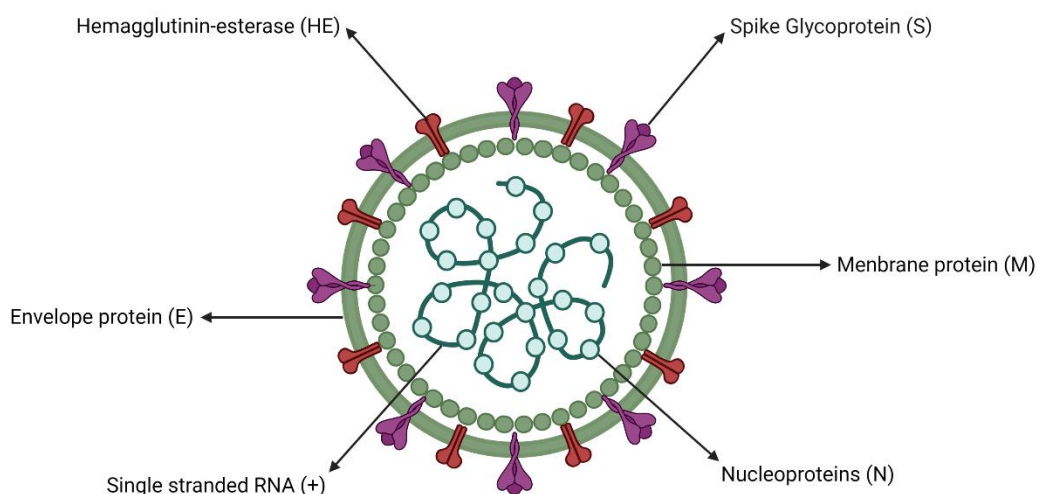
1.1 COVID-19: aspectos epidemiológicos, agente etiológico e formas clínicas

O SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) é um novo coronavírus, inicialmente identificado em Wuhan, província chinesa de Hubei e que desencadeou uma pandemia denominada COVID-19. A família *Coronaviridae* é grande e inclui 7 espécies capazes de causar infecções em seres humanos que podem ser brandas (resfriados comuns) ou mais graves como é o caso das associadas às pandemias: SARS-CoV, causadora da Severe Respiratory Syndrome Coronavirus entre 2002-2003; MERS-CoV, causadora da Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus em 2012 e a espécie SARS-CoV-2, causadora da atual pandemia. Até esta data foram registrados mais de 608 milhões de casos confirmados de Covid-19 e mais de 6 milhões de mortes associadas a este vírus WHO (2020).

A origem deste novo coronavírus permanece obscura. Segundo ANDERSEN et al., (2020), estudos de estrutura genética sugerem que é bastante improvável que o vírus tenha surgido por manipulação laboratorial. Estes pesquisadores sugerem 3 hipóteses para explicar sua origem: 1. seleção natural em um hospedeiro animal seguida de transferência zoonótica, 2. transferência zoonótica para humano seguida de seleção natural no hospedeiro humano, 3. seleção ocorrida in vitro ou in vivo em culturas celulares ou modelo animal, respectivamente, seguida de transferência para ser humano. Estes processos de seleção envolveriam especialmente mutações na região RBD (receptor binding domain) que é responsável pela interação com a molécula receptora nas células humanas que é a angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). Morcegos e pangolins são sugeridos como os prováveis reservatórios do vírus progenitor.

A estrutura viral e o mecanismo de infecção das células-alvo já são bem descritos na literatura. O SARS-CoV-2, que pertence ao grupo dos beta-coronavírus juntamente com o SARS-CoV e o MERS-CoV, é um vírus

envolvido contendo uma única molécula de RNA⁺ de fita simples associada com várias cópias de nucleoproteínas. Este nucleocapsídeo é envolto por uma bicamada lipídica na qual estão ancoradas 4 glicoproteínas estruturais: spike, hemaglutinina-acetil transferase, glicoproteína de membrana, glicoproteína do envelope e uma fosfo-proteína também associada ao envelope, como ilustrado na **figura 1**.

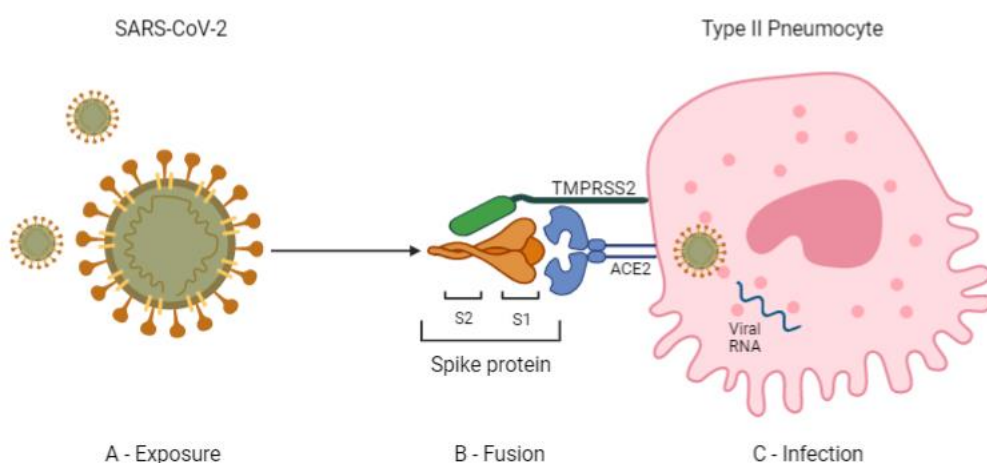


Fonte: Created with Biorender.com

Figura 1. Representação da estrutura do SARS-CoV-2. A partícula viral é constituída pelas glicoproteínas estruturais: Spike (S), Hemaglutinina-acetil Transferase (HE), Envelope (E) e Membrana (M) e contém em seu núcleo RNA (+) de fita simples associado a nucleoproteínas (N), que juntos formam o nucleocapsídeo.

O processo de infecção envolve a proteína S (spike) que é exposta sob a forma trimérica e cuja distribuição na superfície da partícula viral forma estruturas similares a espículas conferindo a aparência de uma coroa no microscópio eletrônico; esta conformação resultou no nome coronavírus (HELMY et al., 2020). A Spike é composta pelos domínios S1 e S2, sendo que a região RBD, que é responsável pela ligação na célula-alvo, está

localizado no S1 enquanto a região responsável pela fusão entre o vírus e a célula-alvo está situada no domínio S2 (BORGES, 2020). A ACE2, como referido acima, funciona como receptora do vírus enquanto a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2), também presente na superfície da célula-alvo, catalisa a clivagem proteolítica facilitando a fusão viral com a célula-alvo. O processo de infecção está ilustrado na **figura 2**. Vários receptores alternativos e proteases celulares adicionais estão envolvidos neste processo de infecção (MASRE et al., 2021). Apesar do pulmão e da traqueia serem descritos como os alvos primários do vírus, já se sabe que o vírus também pode infectar rins, intestino delgado, pâncreas, vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e células endoteliais vasculares (LIU et al., 2021).



Fonte: Created with Biorender.com

Figura 2. Processo de infecção de célula humana pelo SARS-CoV-2. (A) Os indivíduos são expostos ao SARS-CoV-2 principalmente através das vias aéreas superiores e por esse motivo as células da traqueia e do pulmão são consideradas alvos primários de infecção. (B) Após a exposição ao vírus, a proteína denominada Spike (subdividida em domínio S1 e S2), expressa na superfície da partícula viral, interage com as proteínas de membrana do hospedeiro (ACE2 e TRPMSS2) respectivamente, resultando na fusão do vírus/célula. (C) Uma vez concluídos os processos de fusão e passagem do material genético do vírus para o interior da célula, a replicação tem início.

Diferentes graus de gravidade podem ser observados nos indivíduos com COVID-19. Segundo (BAJ et al., 2020), estas manifestações podem ser agrupadas em 5 graus de gravidade crescente cujos sintomas mais típicos são listados no quadro abaixo.

Quadro 1. Níveis de gravidade e seus sintomas na infecção por SARS-CoV-2. Indivíduos com COVID-19 têm sido classificados em 5 níveis distintos de acordo com os sintomas.

| QUADRO CLÍNICO DE PACIENTES COM COVID-19 – GRAVIDADE x SINTOMAS | |
|--|--|
| GRAVIDADE DA DOENÇA | SINTOMAS |
| Assintomática | - Ausência de manifestações clínicas - Sem alterações na tomografia e raio X |
| Leve | - Febre, tosse seca, dor de garganta, espirros, cansaço, dor muscular, dor de cabeça e perda do olfato - Usualmente sem alterações nos exames de imagem pulmonar |
| Moderada | - Sintomas de quadro pneumônico, febre, tosse seca - Exames de imagem do pulmão mostram opacidade pulmonar lembrando vidro fosco além de áreas de consolidação |
| Severa | - Dispnéia, hipóxia e mais de 50% de comprometimento pulmonar, diarreia, vômitos e náusea - Exames de imagem mostram opacidades típicas, consolidação, efusão pleural e linfadenopatia |
| Crítica | - Dificuldade respiratória, dor torácica, limitação da mobilidade e fala, evolução para síndrome do estresse respiratório, arritmia, insuficiência cardíaca e hepática, encefalopatia, coagulação intravascular disseminada e choque séptico |

Fonte: (BAJ et al., 2020)

1.2 Resposta imune, “cytokine storm” e patogênese pulmonar

Segundo AHMADPOOR & ROSTAING (2020), na maioria dos pacientes, os quais desenvolvem a forma benigna da doença, ocorre ativação da resposta imune inata seguida de resposta imune específica que juntas controlam a replicação viral e determinam recuperação clínica. De acordo com estes autores, em indivíduos saudáveis e não idosos, a interação do vírus com o TLR-7, localizado nos endossomas, desencadeia uma produção inicial de IFN- γ , IL-12 e IL-6, seguida da expansão de células Th, ativação de linfócitos B com subsequente produção de anticorpos e diferenciação de linfócitos Tc. Entretanto, quando o sistema imunológico do indivíduo afetado é incapaz, por razões diversas (comorbidades e imunossenescência, por exemplo), de montar uma resposta imune eficiente, ocorrerem várias alterações imunológicas envolvendo tanto a imunidade inata quanto a específica. As alterações mais comuns incluem queda na quantidade de linfócitos, incluindo na subpopulação de T reguladores e exaustão funcional de linfócitos citotóxicos (Tc e NK) (YE; WANG; MAO, 2020; ZHENG et al., 2020). A diminuição de linfócitos inclui tanto os TCD4+ quanto os TCD8+ e é acompanhada de queda na produção de IFN- γ (WU et al., 2020). Os casos mais graves também são caracterizados por elevada quantidade de polimorfonucleares e aumento nos níveis de proteína C reativa (OUYANG et al., [s.d.]).

Um dos aspectos que vem sendo enfatizado na patogênese da COVID-19 é a ocorrência de uma “cytokine storm” derivada principalmente de células da imunidade inata. Segundo vários relatos, esse fenômeno está associado com doença mais grave e determina a síndrome do desconforto respiratório que pode progredir para a síndrome de falência de múltiplos órgãos e finalmente para óbito do paciente (YE; WANG; MAO, 2020). Evidências clínicas confirmam um estado hiperinflamatório nestes pacientes caracterizado por níveis elevados de diversas citocinas e quimiocinas, incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-7, GM-CSF, IL-12, IL-17,

IP-10, MIP-1 α , MCP-1 (MEHTA et al., 2020). Exames post-mortem mostraram necrose tecidual e infiltração intersticial de macrófagos no pulmão, coração e mucosa gastrointestinal em pacientes com elevada concentração de citocinas inflamatórias (XU et al., 2020b).

A COVID-19 atinge de forma mais brutal a estrutura pulmonar. Segundo MASON (2020), considerando uma perspectiva biológica, a gravidade do envolvimento pulmonar está associada à região do pulmão na qual o vírus está em processo de multiplicação. Resumidamente, este comprometimento envolve 3 estágios. No estágio inicial, que seria assintomático, o vírus inalado se liga em células epiteliais presentes na cavidade nasal e inicia um processo de replicação que é acompanhado de uma discreta ativação da resposta imune inata. No estágio 2, caracterizado pelo aparecimento de sintomas clínicos brandos, o vírus se propaga para a parte inferior do sistema respiratório e a resposta imune inata se torna mais acentuada. Algumas quimiocinas, como por exemplo a CXCL10, têm sido sugeridas como marcadores preditores de síndrome respiratória aguda grave (TANG et al., 2005). No estágio 3 o vírus atinge as unidades de troca gasosa, infecta células alveolares e, possivelmente, causa apoptose e dano alveolar difuso.

No contexto acima queremos investigar se o processo inflamatório que ocorre no pulmão e a produção elevada de citocinas podem ser mimetizados pela instilação nasal do vírus morto em modelo murino. Uma vez confirmada esta possibilidade, avaliaremos se estas alterações podem ser controladas por vitamina D (vitD). A escolha dessa vitamina se baseia fundamentalmente em nossa linha de pesquisa. Já demonstramos anteriormente que a vitD controla de forma eficaz o processo inflamatório que ocorre no sistema nervoso central (SNC) durante o desenvolvimento da EAE (CHIUSO-MINICUCCI et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2020; ZORZELLA-PEZAVENTO et al., 2017). Aliado a isto, a literatura indica que a vitD aplicada por via intranasal (IN) determina tanto efeito anti-inflamatório local quanto no SNC (ENKHJARGAL et al., 2017; KIM et al., 2019). Além

destas propriedades anti-inflamatórias, a vitD também vem sendo apontada na literatura recente como uma das substâncias com potencial terapêutico/imunorregulador para a COVID-19. Tem sido sugerido, por exemplo, que a deficiência de vitD em países do hemisfério norte seria um fator adicional para a maior gravidade da infecção nestas regiões em comparação com o hemisfério sul (RHODES et al., 2020). Em revisão recente, GRANT et al., (2020), discutem alguns aspectos que justificariam a suplementação com esta vitamina para reduzir o risco de infecção por vírus influenza e SARS-CoV-2. De acordo com estes autores, os principais efeitos protetores da vitD seriam através de indução de catelicidinas e defensinas as quais possuem efeito antiviral, e de inibição sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias.

A possibilidade de que a vitD possa controlar, de forma concomitante, processos inflamatórios no SNC e no pulmão, nos parece muito promissora no contexto atual da COVID-19, tanto para os portadores de EM como de outras patologias neurológicas.

1.3 Esclerose múltipla: modelo experimental, imunopatogênese e fatores ambientais

A EM é uma doença inflamatória e desmielinizante do SNC que é descrita como a principal causa de incapacidade neurológica em adultos jovens (HOHLFELD, 2009). A doença afeta 2,3 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo maior prevalência na Europa e na América do Norte (AARLI et al., 2014). No continente americano a incidência é de 8,3 casos a cada 100.000 habitantes (WHO, 2008) e a Associação Brasileira de EM estima que 40 mil brasileiros estão atualmente afetados.

A maioria dos pacientes apresenta um quadro transitório de sintomas com períodos de exacerbação e remissão da doença, seguido por uma fase secundária progressiva, caracterizada por perdas irreversíveis e neurodegeneração (HOHLFELD, 2009). As manifestações clínicas da EM

incluem fraqueza de um ou mais membros, perda da visão, falta de coordenação motora, depressão e fadiga (GELFAND, 2014).

O modelo experimental mais utilizado para estudar diferentes aspectos da EM tais como imunopatogênese e alternativas terapêuticas é conhecido como encefalomielite autoimune experimental (EAE) a qual é induzida em animais de diferentes espécies, principalmente em distintas cepas de camundongos. A EAE é desencadeada por imunização com antígenos derivados da bainha de mielina (doença ativa) ou por transferência adotiva de linfócitos T isolados de animal previamente imunizado com estes antígenos (doença passiva). As manifestações clínicas e as alterações imunopatogênicas observadas na EAE variam um pouco entre os diferentes animais e as distintas cepas de camundongos, mas parecem refletir justamente a heterogeneidade encontrada na doença humana correspondente. As duas cepas de camundongos utilizadas com mais frequência para indução de EAE são a C57BL/6 e a SJL (SIMMONS et al., 2013) as quais mimetizam a EM de caráter crônico e remitente-recorrente, respectivamente. Nestes dois modelos ocorre um processo inflamatório no SNC, em especial na medula espinal, seguido de desmielinização e manifestações de paralisia flácida ascendente os quais permitem investigar o efeito deletério ou protetor de vários agentes infecciosos, drogas e procedimentos vacinais.

Estudos em amostras derivadas de pacientes e de animais com EAE vêm permitindo revelar detalhes da imunopatogênese. Está demonstrado que o processo inflamatório no SNC resulta em desmielinização, morte dos oligodendrócitos, dano axonal, gliose e neurodegeneração (HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015; KAWACHI; LASSMANN, 2017). Linfócitos Th1, Th17 e Tc específicos para antígenos do SNC são ativados nos órgãos linfoides secundários e então migram para o SNC onde são reativados por reconhecimento local de antígenos próprios, iniciando assim o processo de lesão inflamatória autoimune (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; HARTUNG et al., 2014). As células Th17 também

desempenham um papel importante na patogênese da EM contribuindo para a ruptura da barreira hematoencefálica e para o processo inflamatório (WOJKOWSKA et al., 2014). Ênfase também tem sido dada à participação de células T reguladoras (Tregs), visto que deficiências numéricas e funcionais destas células têm sido descritas em pacientes com EM (KOUCHAKI et al., 2014). Células da imunidade inata tais como microglia e macrófagos também participam ativamente da patogênese da EM/EAE. Estudos mostram que estes fagócitos internalizam e degradam a bainha de mielina, dando início aos processos inflamatório e desmielinizante (FISCHER; ZELINKA; MILANI-NEJAD, 2015). A contribuição dos astrócitos para a progressão da doença também vem sendo investigada (CORREALE, 2014). Esse processo inflamatório é significativamente mediado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), ou seja, radicais livres derivados do oxigênio molecular, os quais podem ser formados nas células durante os processos oxidativos, principalmente na cadeia respiratória através do transporte mitocondrial de elétrons (OHL; TENBROCK; KIPP, 2016). Microglia ativada e macrófagos infiltrantes liberam vários mediadores pró-inflamatórios e radicais livres como superóxido, hidroxil, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (COLTON and GILBERT, 1993). As EROs oxidam a maioria dos componentes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, provocando alterações estruturais e, conseqüentemente funcionais, através do processo de peroxidação. Para impedir os efeitos deletérios das EROS são ativados mecanismos de defesa antioxidantes. Existem basicamente dois grupos de antioxidantes: enzimas com atividade antioxidante (superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase) e antioxidantes não enzimáticos (vitamina C, α -tocoferol, glutatona reduzida, vitamina D e selênio) (Halliwell and Gutteridge, 2007; RAYMAN, 2012). Entretanto, a produção excessiva de EROs e/ou redução no sistema de defesa antioxidante endógeno determina estresse oxidativo (Lopes, Oliveira, and Soares Fortunato, 2008) que é considerado um evento primordial na

patogênese da EM (MATUTE-BLANCH; MONTALBAN; COMABELLA, 2017). O estresse oxidativo está diretamente associado com um sistema denominado inflamassoma que 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. O inflamassoma é ativado em resposta a 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 também por um tipo de morte celular denominado piroptose (MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011). O inflamassoma NLRP3 é o que se encontra descrito com maiores detalhes até o momento e está amplamente associado às doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (WEN; TING; O'NEILL, 2012). Para ativação de NLRP3 e formação do inflamassoma são necessários dois sinais: o sinal 1 ou priming, desencadeado pela ativação do NF- κ B por TLRs, NLRs e receptores de citocinas, o que resulta na transcrição de NLRP3 e pró-IL-1 β (BAUERNFEIND et al., 2009). O segundo sinal é determinado por agonistas que ativam o complexo inflamassoma e conseqüentemente a caspase-1. Esse segundo sinal pode ser por efluxo de potássio (K⁺), translocação mitocondrial, produção de EROs e liberação de DNA mitocondrial. Está comprovado que as EROs ativam o inflamassoma NLRP3 no decurso do diabetes tipo II experimental em camundongos (ZHOU et al., 2010). As EROs também têm sido descritas como ativadoras do inflamassoma NLRP3 no SNC em camundongos infectados com vírus. Aspectos referentes à participação do inflamassoma em diferentes doenças inflamatórias que afetam o SNC vêm sendo alvo de muita investigação e discussão tanto para que os mecanismos patogênicos destas doenças sejam conhecidos como também para se avaliar a possibilidade de utilizar esta plataforma como alvo terapêutico (VOET et al., 2019). A literatura sugere fortemente que a ativação do inflamassoma esteja relacionada com a progressão da EM visto que as citocinas sintetizadas e liberadas através deste complexo proteico, como é o caso

das IL-1 β e IL-18, atuam na diferenciação e manutenção das células Th1 e Th17 que são subpopulações celulares altamente envolvidas na patogênese da doença (CHUNG et al., 2009). Além disso, há uma elevada expressão de caspase-1 nas lesões localizadas no SNC e nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com EM (MING et al., 2002). Em consonância com estes achados, camundongos com EAE exibem elevada expressão de NLRP3 na medula espinhal, enquanto camundongos NLRP3^{-/-} desenvolvem doença mais branda, decorrente da redução do infiltrado inflamatório, menor produção de citocinas encefalitogênicas e preservação da bainha de mielina (GRIS et al., 2010).

O desenvolvimento da EM depende de predisposição genética, estilo de vida e fatores ambientais. Existem fortes evidências da associação entre EM e baixos níveis de vitamina D, obesidade durante a adolescência, tabagismo e infecções virais (ALFREDSSON; OLSSON, 2019). A possibilidade de que o vírus Epstein-Barr (EBV) seja um gatilho importantíssimo para o desenvolvimento da EM foi recentemente reforçada pelo trabalho de (BJORNEVIK et al., 2022). Estes autores estudaram uma coorte de mais de 10 mil jovens adultos (militares) e encontraram 955 indivíduos com EM. Constataram que o risco de desenvolver esta patologia aumentou 32 vezes após a infecção com o EBV mas não aumentou após a infecção com outros vírus. Um achado bastante interessante foi o aumento dos níveis de neurofilamento de cadeia leve que é um biomarcador de degeneração neuroaxonal, após a soroconversão anti-EBV.

Nosso laboratório dispõe de bastante experiência com modelos experimentais de EM, especialmente com o modelo de doença crônica pois este vem sendo utilizados no estudo de fatores ambientais que podem afetar o desenvolvimento da EAE e na busca de terapias alternativas ou adjuntas para a EM (FRAGA-SILVA et al., 2015; PINKE et al., 2020; ZORZELLA-PEZAVENTO et al., 2017). Neste trabalho vamos explorar o modelo desenvolvido por animais C57BL/6 imunizados com um peptídeo derivado da mielina do oligodendrócito (MOG35-55). Este modelo de

doença inflamatória crônica, que mimetiza a imunopatogênese observada na EM, será utilizado para investigar se a resposta imune induzida por imunização subcutânea com vírus inativado determina agravamento desta patologia desmielinizante.

1.4 Esclerose múltipla & COVID-19 & vacinação

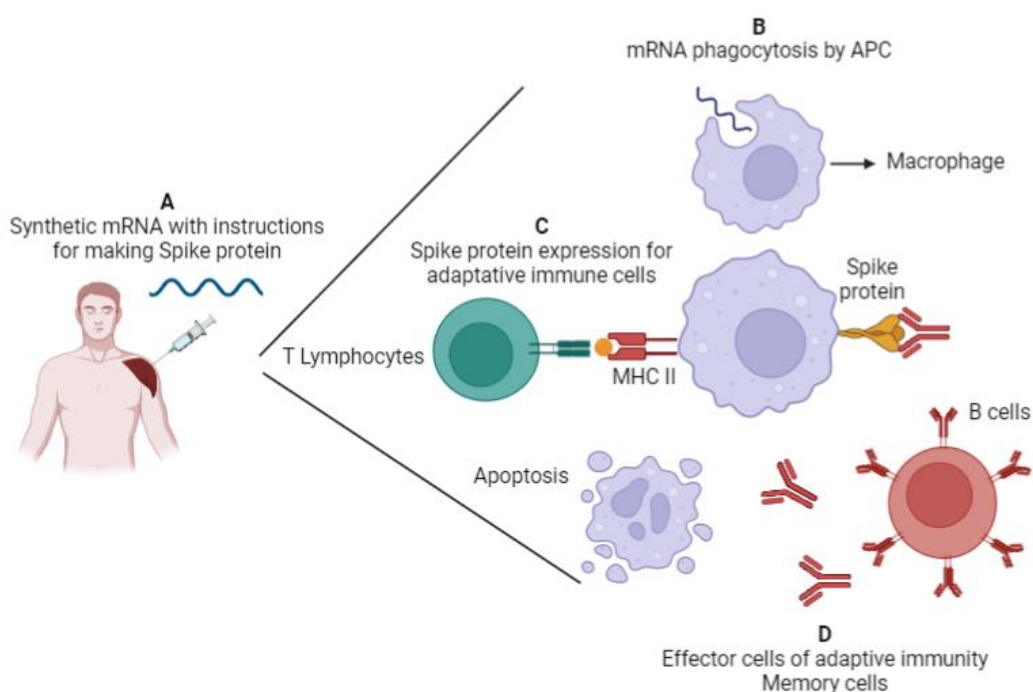
A relação entre COVID-19 e EM é bastante complexa e deve ser analisada sob diferentes ângulos. Uma das primeiras indagações nesta área foi se os pacientes com EM, por estarem sob terapia imunossupressora ou imunomoduladora, teriam maior risco de adquirir esta infecção. Algumas publicações têm indicado que a susceptibilidade ao SARS-CoV-2 é afetada pelo tipo de droga em questão; IFNs e acetato de glatiramer foram associados com risco reduzido enquanto o uso de anticorpos monoclonais anti-CD20 determinou aumento do risco (REDER et al., 2021). Fatores como comorbidades, obesidade e ancestralidade negra também parecem contribuir para aumentar o risco de infecção nestes pacientes (REDER et al., 2021). Outros relatos não confirmaram este risco aumentado de COVID-19 em pacientes com EM mas sim um maior risco de hospitalização nestes indivíduos (EVANGELOU et al., 2021; ZABALZA et al., 2021).

Outra questão importante refere-se ao possível efeito desta infecção na evolução da EM. Investigações indicam que o SARS-CoV-2 pode desencadear tanto pseudo surtos quanto surtos verdadeiros (BELLUCCI et al., 2021; GARJANI et al., 2021). Um aspecto muito interessante que vem sendo também discutido é a possibilidade de que a infecção pelo SARS-CoV-2 atue como um fator ambiental que contribui para a indução de autoimunidade envolvendo o SNC, incluindo a EM. A entrada do SARS-CoV-2 no SNC ativa a microglia, desencadeando neuroinflamação crônica e possivelmente neurodegeneração. A análise transcriptômica do SARS-CoV-2 revela similaridade com vários epítomos do SNC o que pode,

juntamente com a cytokine storm e vários autoanticorpos, culminar em uma condição autoimune (GUPTA; WEAVER, 2021).

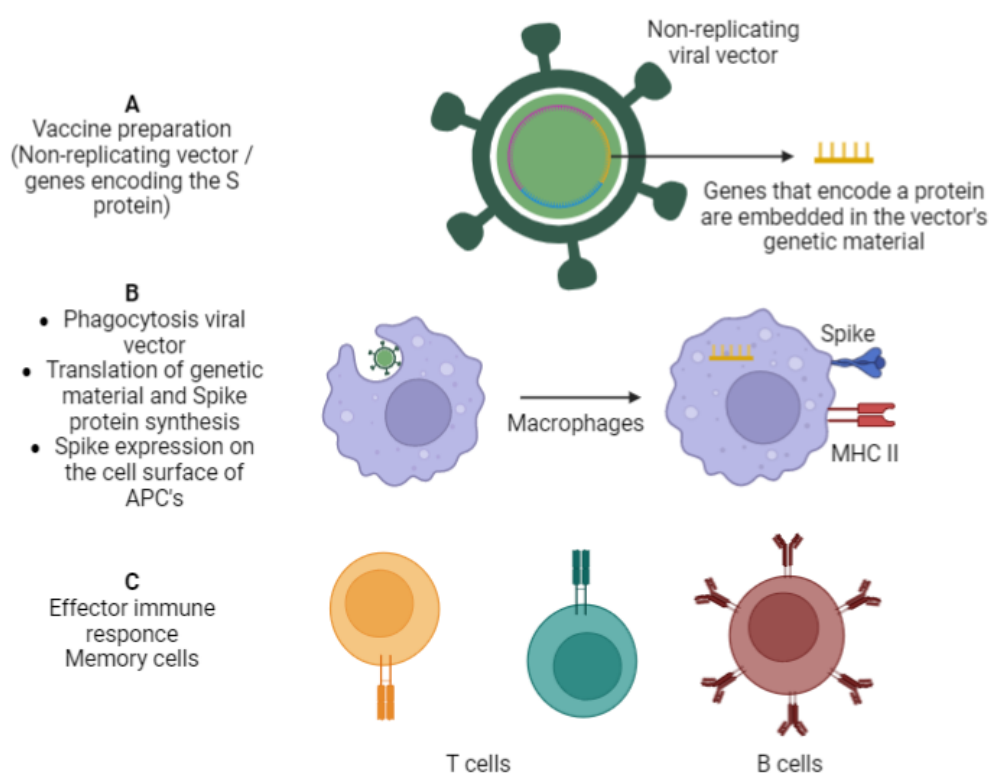
Existe uma concordância geral de que pacientes com EM não devem suspender a terapia mas que devem receber a imunização anti-COVID-19. Recomenda-se, entretanto, uma análise acurada do tipo de terapia uma vez que algumas delas são imunodepletoras o que pode diminuir consideravelmente a eficácia das vacinas. Por exemplo, pacientes em tratamento com ocrelizumab, rituximab e alemtuzimab devem discutir com seus médicos a estratégia de imunização para otimizar a eficácia da vacina.

Várias vacinas, baseadas em distintos mecanismos de ação, vêm sendo aprovadas para controle da COVID-19, incluindo principalmente as inativadas, as baseadas em vetores virais não replicantes e aquelas contendo subunidades tais como proteínas e mRNA (FRANCIS et al., 2021). Os programas vacinais adotados priorizaram, inicialmente, os indivíduos mais vulneráveis e os pacientes com EM têm sido vistos como de risco mais elevado. Todas as vacinas aprovadas são capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra a proteína Spike mas só as baseadas em vetor viral e em ácidos nucleicos (mRNA neste caso), desencadeiam imunidade celular do tipo Tc (JEYANATHAN et al., 2020). Segundo a National Multiple Sclerosis Society, as três vacinas mais recomendadas para os pacientes que convivem com a EM são a Pfizer BioNTech, a Moderna e a Janssen/J&J. As 2 vacinas de mRNA são constituídas por mRNA codificando a Spike e envolto por nanopartículas.



Fonte: Created with Biorender.com

Figura 3. Mecanismo de ação das vacinas de mRNA. O mRNA mensageiro sintético contendo as informações para síntese da proteína (S) é produzido em laboratório e introduzido no indivíduo através da vacinação. (B) Uma vez localizado pelas células apresentadoras de antígeno APCs), ocorre o processo de fagocitose desse material genético. (C) As APC's então sintetizam a proteína codificada, processam a mesma e apresentam os epítomos, associados às moléculas de histocompatibilidade de classe, aos linfócitos Th. (D)Essa apresentação inicia a imunidade efetora e a geração de memória imunológica.



Fonte: Created with Biorender.com

Figura 4 Mecanismo de ação da vacina baseada em vetor viral não replicante. (A) A vacina é elaborada com a introdução dos genes responsáveis pela síntese da proteína Spike no material genético de um vírus sem capacidade de causar doença e replicação. (B) O vírus é fagocitado pelas APCs e os genes são copiados em mRNA sendo a Spike resultante da tradução do mRNA expressa na superfície das células do hospedeiro, além de também serem processadas e apresentadas através de moléculas de MHC II. (C) A células da imunidade adaptativa são especificamente ativadas ocorrendo a montagem da resposta imune efetora e memória imunológica.

Dois aspectos vêm recebendo atenção especial no contexto da vacinação dos pacientes com EM. O primeiro deles se refere à eficácia dessas vacinas considerando que estes indivíduos estão sob terapia imunossupressora ou que podem apresentar alterações imunológicas. O uso de DMTs (disease modifying therapies) pode determinar decréscimo da eficácia vacinal e isto foi observado nos pacientes fazendo uso de ocrelizumab, rituximab, cladribine e esteróides. O grau de segurança das vacinas anti-COVID-19 vem sendo investigado e tem mostrado resultados

divergentes. Evidências preliminares realmente não apontaram para aumento de risco de surtos nestes pacientes (ACHIRON et al., 2021). Entretanto, alguns achados têm sugerido o aparecimento de surtos após vacinação. Inicialmente foram relatados 2 casos isolado de surtos agudos após vacinação anti-COVID-19 (ETEMADIFAR et al., 2021; MANISCALCO et al., 2021). Mais recentemente, NISTRÌ et al., (2021) relataram o aparecimento de surtos em 16 pacientes convivendo com EM os quais foram acompanhados entre os meses de março e junho de 2021, após terem sido vacinados. Três destes 16 pacientes desenvolveram o primeiro episódio de EM após terem sido vacinados e os outros 13 já tinham diagnóstico prévio de EM. As vacinas empregadas nestes indivíduos foram Pfizer (10 pacientes), Moderna (2 pacientes) e AstraZeneca (4 pacientes). Todos os surtos ocorreram entre 3 dias e 3 semanas após a primeira dose ou após o reforço. Os 16 pacientes descritos apresentaram evidências de comprometimento na MRI condizente com o aparecimento dos surtos. Os autores alertam para a necessidade de esclarecer se esta associação temporal foi causal ou incidental.

2 Justificativa

Um dos aspectos mais importantes desta infecção é o comprometimento pulmonar que é o órgão alvo inicial e que dependendo da gravidade, pode resultar em doença muito prolongada ou morte do paciente. A linha de pesquisa do nosso laboratório está voltada para a imunopatogênese dos processos inflamatórios e seu controle por diferentes produtos, como por exemplo a vitamina D. A primeira abordagem dessa investigação foi estabelecer e caracterizar um modelo de inflamação pulmonar induzido por instilação nasal de SARS-CoV-2 inativado e, posteriormente, avaliar a eficácia terapêutica ou imunomoduladora da administração de vitamina D. A relevância desta análise reside no fato deste processo inflamatório ser provavelmente o aspecto mais acentuado da patogênese desta infecção e

por ter a vitamina D características que facilitariam sua adoção como terapia. Neste sentido, ressaltamos que esta vitamina é produzida de forma endógena após exposição solar, é dotada de reconhecida capacidade imunomoduladora e já vem sendo sugerida ou adotada terapeuticamente em doenças inflamatórias (AO; KIKUTA; ISHII, 2021). Inclusive LAKKIREDDY et al., (2021) mostraram recentemente que elevadas doses de vitamina D diminuíram vários marcadores inflamatórios em pacientes com COVID-19 sem desencadear efeitos colaterais.

Outro processo inflamatório no qual temos interesse ocorre no sistema nervoso central (SNC) no decurso da esclerose múltipla (EM) que é uma doença associada a uma resposta autoimune contra componentes da mielina e descrita como a principal causa de incapacidade neurológica em adultos jovens (HOHLFELD, 2009). Para estudá-la utilizamos um modelo murino desta doença denominado encefalomielite autoimune experimental (EAE). Neste contexto, nos interessamos pelos possíveis efeitos da resposta imune induzida pelo vírus, incluindo por preparações vacinais, na evolução da EAE. Avaliamos então o efeito da imunização com o SARS-CoV-2 inativado e associado ao alúmen, o que é semelhante ao processo vacinal com a Coronavac, amplamente empregada em nosso país, no desenvolvimento clínico e imunológico da EAE.

3 Objetivos

1. Induzir um modelo murino de inflamação pulmonar por instilação nasal de SARS-CoV-2 Inativado.
2. Caracterizar as populações celulares envolvidas na inflamação.
3. Investigar o efeito do tratamento com vitamina D.
4. Investigar se a resposta imune induzida por antígeno vacinal (virus morto associado ao alúmen afeta as características clínicas e imunológicas da EAE.

Referências Bibliográficas

AARLI, J. A. et al. **Section Editors Global Perspectives ATLAS OF MULTIPLE SCLEROSIS 2013: A GROWING GLOBAL PROBLEM WITH WIDESPREAD INEQUITY.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.msif.org/about-ms/publications->>.

ACHIRON, A. et al. COVID-19 vaccination in patients with multiple sclerosis: What we have learnt by February 2021. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 27, n. 6, p. 864–870, 1 maio 2021.

AHMADPOOR, P.; ROSTAING, L. **Why the immune system fails to mount an adaptive immune response to a COVID-19 infection** *Transplant International* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jul. 2020.

ALFREDSSON, L.; OLSSON, T. Lifestyle and environmental factors in multiple sclerosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 9, n. 4, 1 abr. 2019.

ANDERSEN, K. G. et al. **The proximal origin of SARS-CoV-2** *Nature Medicine* Nature Research, , 1 abr. 2020.

AO, T.; KIKUTA, J.; ISHII, M. **The effects of vitamin D on immune system and inflammatory diseases** *Biomolecules* MDPI, , 1 nov. 2021.

BAJ, J. et al. **COVID-19: Specific and non-specific clinical manifestations and symptoms: The current state of knowledge** *Journal of Clinical Medicine* MDPI, , 1 jun. 2020.

BATAH, S. S.; FABRO, A. T. **Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians** *Respiratory Medicine* W.B. Saunders Ltd, , 1 jan. 2021.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 787–791, 15 jul. 2009.

BELLUCCI, G. et al. **Multiple Sclerosis and SARS-CoV-2: Has the Interplay Started?** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 27 set. 2021.

BJORNEVIK, K. et al. **MULTIPLE SCLEROSIS Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis** *Science*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.

BORGES, A. A. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e

transmissão. In: **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**. [s.l.] EDUFBA, 2020.

CHIUSO-MINICUCCI, F. et al. Treatment with vitamin D/MOG association suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 12 maio 2015.

CHUNG, Y. et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 576–587, 17 abr. 2009.

Colton CA, Gilbert DL. Microglia, na in vivo source of reactive oxygen species in the brain. **Adv Neurol**. 1993; 59:321-6.

CORREALE, J. **The role of microglial activation in disease progression Multiple Sclerosis** SAGE Publications Ltd, , 1 set. 2014.

CUCINOTTA, D.; VANELLI, M. **WHO declares COVID-19 a pandemic Acta Biomedica** Mattioli 1885, , 2020.

DE OLIVEIRA, L. R. C. et al. Calcitriol Prevents Neuroinflammation and Reduces Blood-Brain Barrier Disruption and Local Macrophage/Microglia Activation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 12 mar. 2020.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. **Immunopathology of multiple sclerosis Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 25 set. 2015.

ENKHJARGAL, B. et al. Intranasal administration of vitamin D attenuates blood–brain barrier disruption through endogenous upregulation of osteopontin and activation of CD44/P-gp glycosylation signaling after subarachnoid hemorrhage in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 37, n. 7, p. 2555–2566, 1 jul. 2017.

ETEMADIFAR, M. et al. Acute relapse and poor immunization following COVID-19 vaccination in a rituximab-treated multiple sclerosis patient. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 17, n. 10, p. 3481–3483, 2021.

EVANGELOU, N. et al. **Self-diagnosed COVID-19 in people with multiple sclerosis: A community-based cohort of the UK MS Register Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry** BMJ Publishing Group, , 1 jan. 2021.

FISCHER, A. J.; ZELINKA, C.; MILANI-NEJAD, N. Reactive retinal microglia, neuronal survival, and the formation of retinal folds and detachments. **GLIA**, v. 63, n. 2, p. 313–327, 1 fev. 2015.

FRAGA-SILVA, T. F. C. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis development is aggravated by *Candida albicans* infection. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

FRANCIS, A. I. et al. **Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions** *Postgraduate Medical Journal* BMJ Publishing Group, , 2021.

GARJANI, A. et al. COVID-19 is associated with new symptoms of multiple sclerosis that are prevented by disease modifying therapies. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 52, 1 jul. 2021.

GELFAND, J. M. Multiple sclerosis: Diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 122p. 269–290.

GRANT, W. B. et al. **Evidence that vitamin d supplementation could reduce risk of influenza and covid-19 infections and deaths** *Nutrients* MDPI AG, , 1 abr. 2020.

GRIS, D. et al. NLRP3 Plays a Critical Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Mediating Th1 and Th17 Responses. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 974–981, 15 jul. 2010.

GUPTA, M.; WEAVER, D. F. **COVID-19 as a Trigger of Brain Autoimmunity** *ACS Chemical Neuroscience* American Chemical Society, , 21 jul. 2021.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radical in Biology and Medicine* (4th ed.). **Oxford University Press**: USA, 2007.

HARTUNG, H. P. et al. Immune regulation of multiple sclerosis. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 122p. 3–14.

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, 1 abr. 2020.

HEMMER, B.; KERSCHENSTEINER, M.; KORN, T. **Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis** *The Lancet Neurology* Lancet Publishing Group, , 1 abr. 2015.

HOHLFELD, R. **Multiple sclerosis: Human model for EAE?** *European Journal of Immunology* Wiley-VCH Verlag, , 2009.

JEYANATHAN, M. et al. **Immunological considerations for COVID-19**

vaccine strategies*Nature Reviews Immunology*Nature Research, , 1 out. 2020.

KAWACHI, I.; LASSMANN, H. **Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica***Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*BMJ Publishing Group, , 1 fev. 2017.

KIM, D. Y. et al. Intranasal treatment with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 alleviates allergic rhinitis symptoms in a mouse model. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, v. 11, n. 2, p. 267–279, 1 mar. 2019.

KOUCHAKI, E. et al. **Numerical status of CD4 + CD25 + FoxP3 + and CD8 + CD28-regulatory T cells in multiple sclerosis**. [s.l.: s.n.].

LAKKIREDDY, M. et al. Impact of daily high dose oral vitamin D therapy on the inflammatory markers in patients with COVID 19 disease. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

LIU, J. et al. **SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection***Cell Discovery*Springer Nature, , 1 dez. 2021.

Lopes, J. P., Oliveira, S. M., & Soares Fortunato, J. (2008). [Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications]. **Acta Medica Portuguesa**, 21(3), 293–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674421>

MANISCALCO, G. T. et al. Severe Multiple Sclerosis Relapse After COVID-19 Vaccination: A Case Report. **Frontiers in Neurology**, v. 12, 10 ago. 2021.

MASON, R. J. **Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective***European Respiratory Journal*European Respiratory Society, , 1 abr. 2020.

MASRE, S. F. et al. **Classical and alternative receptors for SARS-CoV-2 therapeutic strategy***Reviews in Medical Virology*John Wiley and Sons Ltd, , 1 set. 2021.

MATUTE-BLANCH, C.; MONTALBAN, X.; COMABELLA, M. Multiple sclerosis, and other demyelinating and autoimmune inflammatory diseases of the central nervous system. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2017. v. 146p. 3–20.

MEHTA, P. et al. **COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression***The Lancet*Lancet Publishing Group, , 28 mar. 2020.

MIAO, E. A.; RAJAN, J. V.; ADEREM, A. **Caspase-1-induced pyroptotic cell death***Immunological Reviews*, set. 2011.

MING, X. et al. **Caspase-1 expression in multiple sclerosis plaques and cultured glial cells.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jns>.

NISTRÌ, R. et al. Case Report: Multiple Sclerosis Relapses After Vaccination Against SARS-CoV2: A Series of Clinical Cases. **Frontiers in Neurology**, v. 12, 22 out. 2021.

OHL, K.; TENBROCK, K.; KIPP, M. **Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action***Experimental Neurology* Academic Press Inc., , 1 mar. 2016.

OUYANG, Y. et al. Title: Down-regulated gene expression spectrum and immune responses changed during the disease progression in COVID-19 patients Affiliations and addresses. [s.d.].

PINKE, K. H. et al. Calming Down Mast Cells with Ketotifen: A Potential Strategy for Multiple Sclerosis Therapy? **Neurotherapeutics**, v. 17, n. 1, p. 218–234, 1 jan. 2020.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, p. 1256–1268, 2012.

REDER, A. T. et al. COVID-19 in Patients with Multiple Sclerosis: Associations with Disease-Modifying Therapies. **CNS Drugs**, v. 35, n. 3, p. 317–330, 1 mar. 2021.

RHODES, J. M. et al. **Editorial: low population mortality from COVID-19 in countries south of latitude 35 degrees North supports vitamin D as a factor determining severity***Alimentary Pharmacology and Therapeutics* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jun. 2020.

RIOU, J.; ALTHAUS, C. L. **Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020***Eurosurveillance* European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), , 30 jan. 2020.

SIMMONS, S. B. et al. **Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals***Trends in Immunology*, ago. 2013.

SINGHAL, T. **A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19)***Indian Journal of Pediatrics* Springer, , 1 abr. 2020.

TANG, N. L. S. et al. Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2333–2340, dez. 2005.

VOET, S. et al. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, jun. 2019.

WEN, H.; TING, J. P. Y.; O'NEILL, L. A. J. **A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases - Did Warburg miss inflammation?** *Nature Immunology*, abr. 2012.

WHO. (2008). *Atlas Multiple Sclerosis Resources in the World 2008*.

WHO. (2022). **Coronavirus disease (COVID-19) pandemic**. Disponível em: https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019?ad-groupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjw4JWZBhApEi-wAtJUN0N9OMdi1X6CJuNW8f2NU6Pca-epwV2SI5gsZ1aWyPGgd2DkU7aKJIEBoCmrMQAvD_BeE. Acesso em: 17 set. 2022.

WINHEIM, E. et al. Impaired function and delayed regeneration of dendritic cells in COVID-19. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 10, 1 out. 2021.

WOJKOWSKA, D. W. et al. Interactions between neutrophils, Th17 Cells, and chemokines during the initiation of experimental model of multiple sclerosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020.

XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, 1 abr. 2020b.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. **The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19** *Journal of Infection* W.B. Saunders Ltd, , 1 jun. 2020.

ZABALZA, A. et al. COVID-19 in multiple sclerosis patients: susceptibility, severity risk factors and serological response. **European Journal of Neurology**, v. 28, n. 10, p. 3384–3395, 1 out. 2021.

ZHENG, M. et al. **Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients** *Cellular and Molecular Immunology* Springer Nature,, 1 maio 2020.

ZHOU, R. et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 2, p. 136–140, fev. 2010.

ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis is successfully controlled by epicutaneous administration of MOG plus vitamin D analog. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 16 out. 2017.

CAPÍTULO 2