

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 25/02/2018.



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



Efeito da infecção com *Candida albicans* no desenvolvimento  
da Encefalomielite Autoimune Experimental

**THAIS FERNANDA DE CAMPOS FRAGA DA SILVA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus 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 micro-organismos*.

Orientadora: *Alexandrina Sartori*

**BOTUCATU – SP  
2016**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Julio de Mesquita Filho"  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeito da infecção com *Candida albicans* no desenvolvimento  
da Encefalomielite Autoimune Experimental

**THAIS FERNANDA DE CAMPOS FRAGA-SILVA**

**ALEXANDRINA SARTORI**

**MARIA SUELI PARREIRA DE ARRUDA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus 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 micro-  
organismos*.

Orientadora: *Alexandrina Sartori*

**BOTUCATU – SP**

**2016**

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

Fraga-Silva, Thais Fernanda de Campos.

Efeito da infecção com *Candida albicans* no desenvolvimento da Encefalomielite Autoimune Experimental / Thais Fernanda de Campos Fraga-Silva. - Botucatu, 2016

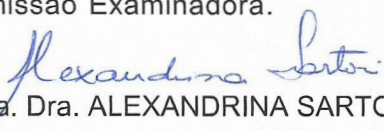
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Alexandrina Sartori  
Coorientador: Maria Sueli Parreira de Arruda  
Capes: 20100000

1. *Candida albicans*. 2. Doenças auto-imunes. 3. Esclerose múltipla. 4. Encefalomielite Autoimune Experimental.  
5. Candidíase.

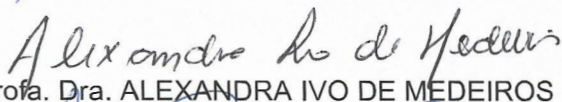
Palavras-chave: *Candida albicans*; Candidíase sistêmica; Encefalomielite Autoimune Experimental; Esclerose múltipla.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE THAIS FERNANDA DE CAMPOS FRAGA DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS.**

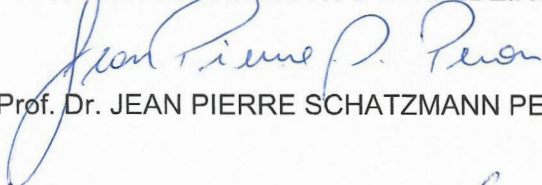
Aos 25 dias do mês de fevereiro do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Sala de Defesa da Pós-Graduação, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. ALEXANDRINA SARTORI do(a) Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biociências de Botucatu / Instituto de Biociências de Botucatu, Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS do(a) Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Prof. Dr. JEAN PIERRE SCHATZMANN PERON do(a) Depto. de Imunologia / Instituto de Ciências Biomédicas IV de São Paulo - USP, Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI do(a) Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu. / Instituto de Biociências de Botucatu, Profa. Dra. MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI do(a) Depto. de Microbiologia e Imunologia / IB/Botucatu - Unesp, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de THAIS FERNANDA DE CAMPOS FRAGA DA SILVA, intitulada **Efeito da Infecção com *Candida albicans* no desenvolvimento da Encefalomielite Autoimune Experimental**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Profa. Dra. ALEXANDRINA SARTORI

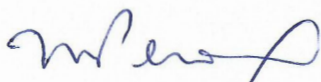
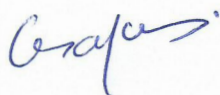


Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS



Prof. Dr. JEAN PIERRE SCHATZMANN PERON

Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI



Profa. Dra. MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI

*Dedicatória*

*Dedico este trabalho à minha família,  
meus pais, José e Izabel, e meus irmãos, Thiago e Gabriele,  
por todo o amor e compreensão.*

*Obrigada por não medirem esforços para me ajudar em todos os momentos  
e tornarem possível a realização dos meus sonhos.*

*Agradecimientos*

*Agradeço,*

*À Dra. Alexandrina Sartori, minha orientadora, pela confiança, orientação e dedicação.  
Serei sempre grata por esses anos de muito aprendizado.*

*À Dra. Maria Sueli Parreira de Arruda, minha co-orientadora, pelas oportunidades concedidas desde a iniciação científica, pela confiança e estímulo para buscar o meu melhor.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  
pela concessão da Bolsa de Doutorado Direto (#13/14353-2)  
e do Auxílio Regular (#12/12540-7).*

*Ao Dr. Robson Francisco Carvalho, à Dra. Ângela Maria V. de Campos Soares  
e à Dra. Sofia Fernanda G. Zorzella-Pezavento,  
pela contribuição durante meu exame de Qualificação.*

*À Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud e o Dr. Rodolfo Thomé por me acolherem no  
Laboratório de Imunopatologias (UNICAMP - Campinas), pela atenção e ensinamentos.*

*Aos professores, alunos e funcionários  
do Departamento de Microbiologia e Imunologia (UNESP – Botucatu) e do  
Departamento de Ciências Biológicas (UNESP – Bauru) pelo suporte técnico e acadêmico.  
Em especial à Dra. Graziela Romagnoli, ao Luiz S. dos Santos (Lula) e ao Thiago Tozi.*

*À Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP – Botucatu) pelo  
suporte técnico. Em especial ao funcionário Davi Müller, sempre disposto a ajudar.*

*Às queridas companheiras do Laboratório de Vacinas e Imunomodulação,  
Sofia Zorzella-Pezavento, Thais Donegá, Larissa Lumi e Fernana Chiuso Minicucci, por me  
receberam com muito carinho e atenção, mas também por todo auxílio teórico e prático  
indispensável para a realização deste trabalho. Gostaria de agradecer também às mais novas  
integrantes, Larissa Ragazo, Karen Pinke e Aline Missio por todo o apoio.*

*Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Imunopatologia Experimental,  
James Venturini, Gisele Locachevic, Débora Almeida, Angela Finato,  
Amanda Ribeiro, Bárbara Amorim, Laysla Leite e a todos que já passaram pelo LIPE,  
por tudo que realizamos e pelos ensinamentos de cada dia.  
Agradeço aos mais “velhos” a parceria desde a iniciação científica.*

*Aos biólogos, veteranos e amigos: Thiago Davanso & Andrea Mourão, Pedro Guerra,  
Filipe Nathan, Ricardo Judice, Leonardo Saldanha, João Alexandre, Abner Carvalho,  
Fernanda Rezende, Sarah Teodoro, Natalia Violato, André Gobatto & Maiara Gonçalves,  
Mônica Fiore e Lucas Farinelli, por todos os ensinamentos, científicos e não científicos.*

*Às minhas amigas-irmãs Camila Marchetti, Luiza Mimura e Nara Lúgia  
por estarem presentes desde a graduação e tornarem o caminho mais feliz.  
Muito obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e por compartilhar tantas alegrias.*

*Ao meu melhor amigo, meu amor, João Alberto Pantaleão.  
Por toda compreensão e incentivo. Por todas as discussões científicas!  
E, por mesmo em momentos não tão bons, me fazer sorrir!  
Obrigada por me proporcionar a felicidade de compartilhar sonhos e conquistas.*

*Aos meus avós, Antônio Fraga e Eva Zanatta,  
Clodemyl Pires e Dirce Corá, por sempre me acolherem,  
pelos grandes ensinamentos da vida e por todo amor e carinho.*

*Finalmente, agradeço aos animais de experimentação.  
Que perdem a vida para que nossas conquistas sejam possíveis.  
“Minha eterna gratidão, meu respeito e a certeza que fiz o máximo para amenizar  
seu sofrimento, aproveitando cada dado extraído, cada experiência profissional,  
e também pessoal, de meu contato com eles”. Marchetti, CM.*

*"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos".*

*Isaac Newton*

*Resumo*

## Resumo

FRAGA-SILVA, T. F. C. Efeito da infecção com *Candida albicans* no desenvolvimento da Encefalomielite Autoimune Experimental. 2016. 100 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

A esclerose múltipla é uma doença autoimune ainda sem cura que acomete o sistema nervoso central (SNC). Evidências observadas em pacientes e em modelos experimentais indicam que infecções fúngicas e/ou derivados fúngicos podem contribuir com a patogênese da doença. Neste contexto, o objetivo deste projeto foi avaliar o efeito da infecção por *Candida albicans* e derivados fúngicos no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE) que é o modelo murino desta patologia. Para avaliar o papel da infecção, camundongos C57BL/6 foram infectados com *C. albicans* três dias antes da indução da EAE. A infecção prévia agravou os sinais clínicos da doença. Este agravamento foi relacionado com a disseminação do fungo para o SNC e aumento da produção de citocinas encefalitogênicas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$ ) tanto na periferia (baço) quanto no SNC. Para avaliar o efeito de derivados fúngicos no desenvolvimento da EAE, camundongos foram inoculados com três doses de gliotoxina ou de leveduras mortas de *C. albicans* após a indução da doença. A inoculação de gliotoxina resultou em sintomatologia mais grave, associada com um intenso infiltrado inflamatório e maior produção de TNF- $\alpha$  no SNC. De forma distinta a inoculação de leveduras mortas resultou em uma doença bem mais branda, com menor porcentagem de células apoptóticas e baixa produção de citocinas encefalitogênicas no SNC. Considerando que recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a vacinação com MOG associada à vitamina D (MOG+VitD) preveniu a encefalomielite, investigamos também se a infecção por *C. albicans* é capaz de quebrar a tolerância induzida por esta vacinação. Para isto, camundongos foram vacinados com MOG+VitD, infectados com *C. albicans* e depois submetidos à indução da EAE. A vacinação determinou proteção caracterizada por melhora significativa da sintomatologia, decréscimo acentuado na produção de citocinas encefalitogênicas no baço e no SNC e expansão de células T reguladoras. No seu conjunto os resultados desta investigação indicam que derivados fúngicos, dependendo de suas características, podem ser deletérios ou protetores no desenvolvimento da EAE.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*; candidíase sistêmica; encefalomielite autoimune experimental; esclerose múltipla.

*Abstract*

## Abstract

FRAGA-SILVA, T. F. C. Effect of *Candida albicans* infection on experimental autoimmune encephalomyelitis development. 2016. 100 p. Thesis (PhD) – Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, 2016.

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease that affects the central nervous system (CNS). Data from patients and experimental models suggest that fungal infection and fungal-derived antigens could contribute to the immunopathogenesis of this pathology. The main objective of this research was to investigate the effect of *C. albicans* and fungal derivatives on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) that is a widely employed animal model to study MS. Initially, C57BL/6 mice were infected with *C. albicans* and three days later they were submitted to EAE induction. Infected animals developed a more severe disease associated with fungus spread to the CNS and increased production of encephalitogenic cytokines as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 and IFN- $\gamma$  by cells from the spleen and the CNS. To test the effect of fungal derivatives mice were submitted to EAE induction and then injected with three doses of gliotoxin or dead yeasts of *C. albicans*. Gliotoxin inoculation resulted in clinical disease aggravation, higher local inflammatory infiltration and higher production of TNF- $\alpha$  by the CNS. Dead *C. albicans* inoculation determined a less severe disease associated with a lower production of encephalitogenic cytokines and a lower degree of apoptosis by CNS eluted cells. Lastly we demonstrated that *C. albicans* infection did not disrupt the prophylactic efficacy of MOG+VitD tolerogenic vaccination. Even in infected mice this vaccine decreased clinical signs, downmodulated the production of encephalitogenic cytokines and also increased the percentage of regulatory T cells. All together these results indicate that *C. albicans* infection and gliotoxin inoculation aggravate EAE development whereas dead *C. albicans* inoculation protected the animals.

**Keywords:** *Candida albicans*; candidíase sistêmica; experimental autoimmune encephalomyelitis; multiple sclerosis.

# *Sumário*

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| 1. Introdução  | 15 |
| 1.1. Esclerose múltipla e Encefalomielite Autoimune Experimental | 16 |
| 1.2. <i>Candida albicans</i> : aspectos gerais e resposta imune  | 18 |
| 1.3. Relação entre esclerose múltipla e fungos                   | 20 |
| 1.4. Relação entre esclerose múltipla e vitamina D               | 22 |
| 1.5. Racional do projeto   | 26 |
| 2. Referências   | 27 |
| 3. Objetivos   | 34 |
| 4. Resultados e Discussão  | 36 |
| 4.1. Artigo científico I   | 38 |
| 4.2. Artigo científico II  | 50 |
| 4.3. Artigo científico III                                       | 73 |
| 5. Conclusões  | 99 |

*Introdução*

## 1. Introdução

### 1.1. Esclerose múltipla e encefalomielite autoimune experimental

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória e desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC) que é a principal causa de incapacidade neurológica em adultos jovens (Hohlfeld, 2009). A doença acomete mais mulheres do que homens, na proporção 2:1. A maior incidência ocorre na Europa (80 a cada 100.000) e a menor incidência na África (0,3 a cada 100.000); no continente Americano a incidência é de 8,3 casos a cada 100.000 habitantes (WHO, 2008). O número estimado de pessoas com EM aumentou de 2,1 milhões em 2008 para 2,3 milhões em 2013 (Browne et al., 2014). Inicialmente a maioria dos pacientes apresenta um quadro transitório de sintomas, com períodos de exacerbação e remissão da doença; a este pode se seguir a fase secundária progressiva, caracterizada por perdas irreversíveis e neurodegeneração (Imitola et al., 2005; Hohlfeld, 2009). As manifestações clínicas iniciais da EM incluem fraqueza de um ou mais membros, perda de visão, falta de coordenação motora e parestesia (Silberberg, 1992).

A causa e a patogênese da EM não são completamente conhecidas, mas os estudos indicam que esta é, fundamentalmente, uma doença autoimune mediada por células Th1/Th17 com especificidade para antígenos do SNC. Essa assertiva se baseia tanto no quadro histológico, que envolve a infiltração de macrófagos e linfócitos T e B (Lucchinetti et al., 2000) como no fato de citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 estarem envolvidas no processo inflamatório e subsequente degeneração axonal, morte dos oligodendrócitos e disfunção neuronal (Elloso et al., 2005; Sospedra & Martin, 2005; Furuzawa-Carballeda et al., 2007). As principais características histopatológicas da EM são: presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos T e B e macrófagos; desmielinização, ocasionada pela destruição da bainha de mielina ou pela morte dos oligodendrócitos; dano ou perda dos axônios e gliose, que se caracteriza por aumento do número de células da glia na substância branca em resposta ao dano no SNC (Constantinescu et al., 2011).

Experimentalmente a EM é estudada utilizando-se o modelo denominado encefalomielite autoimune experimental (EAE) que é induzida em ratos e camundongos por imunização com antígenos derivados de mielina (*myelin basic protein* - MBP, *proteolipid protein* - PLP, *myelin oligodendrocyte glycoprotein* - MOG ou peptídeos derivados destas proteínas) associados com o Adjuvante Completo de Freund (ACF). A transferência adotiva

de linfócitos com receptores de célula T (TCR) específicos para mielina, em animais saudáveis, também desencadeia a doença, indicando que a EAE é uma doença autoimune mediada pela imunidade celular (Link & Xiao, 2001). Em ratos Lewis a EAE se manifesta como doença aguda, grave e monofásica, caracterizada por infiltrado mononuclear meníngeo, perivascular e parenquimal no SNC (Link & Xiao, 2001). Nestes animais, a EAE é de recuperação espontânea e está associada ao desenvolvimento de células T supressoras (Varriale et al., 1994). Embora este modelo seja bastante utilizado, o modelo murino mimetiza melhor o decorso crônico e/ou de exacerbação-remissão visto na patologia humana (Gold et al., 2006). Exemplo disso é a paralisia e o extenso processo de desmielinização, desencadeados pela imunização de camundongos C57BL/6 com o peptídeo (35-55) derivado de MOG (MOG<sub>35-55</sub>). Após a imunização, os animais desenvolvem uma doença crônica que perdura por, pelo menos, 45 dias (Bernard et al., 1997). De acordo com Murphy e colaboradores (2010) a partir do sétimo dia após a indução da EAE já ocorre aumento significativo de linfócitos produtores de IL-17 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ IL-17<sup>+</sup>) no baço, no cérebro e na medula espinhal de camundongos C57BL/6 com EAE induzida por MOG<sub>35-55</sub>. O modelo da EAE induzida por MOG<sub>35-55</sub> em camundongos C57BL/6 tem sido bastante explorado, especialmente em estudos envolvendo procedimentos imunomoduladores e terapêuticos.

De modo geral, a maioria dos autores concorda que fatores ambientais, como os agentes infecciosos, em conjunto com fatores genéticos, favorecem o desencadeamento ou agravamento desta doença. Vírus, como Epstein-Barr e vírus herpes tipo 6, têm sido classicamente associados com EM (Sundqvist et al, 2011; Tait & Straus, 2008). A possibilidade de que infecções fúngicas, como as causadas pela *Candida albicans*, possam contribuir para a gravidade desta patologia tem sido sugerida mais recentemente (Benito-León et al, 2010; Pisa et al, 2011; Pisa et al, 2013).

## 1.2. *Candida albicans*: aspectos gerais e resposta imune

O gênero *Candida* abrange fungos pleomórficos que vivem como comensais no trato gastrointestinal e urinário de muitas espécies de mamíferos. Em indivíduos saudáveis raramente causam infecção persistente, mas sob certas circunstâncias, esses fungos podem agir como patógenos, com envolvimento frequente de órgãos vitais como o cérebro, fígado e rins (Van De Veerdonk et al., 2010). *Candida* spp. é o patógeno mais comum em infecções fúngicas hematogênicas (Arendrup, 2013), sendo a *C. albicans* a espécie mais frequente, seguida pela *C. tropicalis*, *C.* do complexo *psilosis* e *C. glabrata* (Nucci et al., 2010).

Enquanto estão nas mucosas, isto é, em sua forma comensal, esses fungos encontram-se na forma de leveduras; ao atingir tecidos mais profundos, se transformam em hifas e/ou pseudohifas, que são formas virulentas do fungo (Brown & Gow, 1999). Este processo (morfogênese) constitui seu principal mecanismo de virulência. Segundo alguns pesquisadores, ele estaria relacionado, pelo menos em parte, ao fato das hifas impedirem a maturação de células dendríticas (DCs) e a ativação do sistema complemento (Romagnoli et al., 2004; Van Der Graaf et al., 2005).

Os mecanismos que mantêm o fungo no estado comensal e impedem a passagem para a circulação sistêmica dependem tanto da resposta imune inata como da adaptativa (Fidel & Huffnagle, 2005). Os neutrófilos são as células mais eficientes para matar e/ou inibir a formação de hifas e pseudohifas (Schuit, 1979). O reconhecimento do fungo pelas células da imunidade inata se dá por diferentes receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como, por exemplo, os do tipo *toll-like* (TLR), a dectina-1 e o receptor de manose (Netea et al., 2006). Destes, os TLRs são os mais estudados. Em DCs, o reconhecimento das leveduras ocorre via TLR-4 e resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias e indução de resposta adaptativa do tipo Th1 (d'Ostiani et al., 2000). Por outro lado, a interação com as hifas ocorre via TLR-2 e resulta na produção de citocinas anti-inflamatórias e na indução de uma resposta adaptativa do tipo Th2 (Netea et al., 2002; Kundu & Noverr, 2011). Segundo Curtis & Way (2009) a subpopulação de células Th17 confere proteção contra bactérias extracelulares e fungos, como a *C. albicans*. A possibilidade das células Th17 estarem envolvidas na modulação das candidíases é apoiada pelos achados de Saijo & Iwakura (2011). Segundo estes pesquisadores, a ligação das moléculas fúngicas  $\beta$ -glucanas e  $\alpha$ -mananas aos receptores dectina-1 e dectina-2, presentes em DCs e macrófagos, levaria a indução e expansão de células Th17.

Embora sejam raros os relatos clínicos de acometimento do cérebro em pacientes com candidíase sistêmica, *Candida* spp. é frequentemente encontrada em cérebro de pacientes que morreram devido à esta infecção (Parker et al, 1981). A disseminação deste patógeno para o cérebro é mais comum em recém-nascidos (Faix & Chapman, 2003), sendo também responsáveis por grande parte dos abscessos cerebrais em pacientes imunocomprometidos (Yampolsky et al, 2010). O acometimento do SNC associado à candidíase sistêmica experimental vem sendo relatado por alguns autores. Lionakis e colaboradores (2011) observaram expansão significativa da microglia no cérebro de camundongos C57BL/6 fêmeas após infecção. Os autores sugerem que a gliose associada ao acúmulo transitório de neutrófilos controla a infecção no cérebro. Recentemente constatamos que na infecção sistêmica utilizando a cepa FCF14, o fungo se dissemina para o cérebro e induz migração de fagócitos peritoneais para os focos de infecção (Fraga-Silva et al., 2013).

Para invadir o SNC a *C. albicans* precisa atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE). As células endoteliais da microvasculatura do cérebro (Human Brain Microvascular Endothelial Cells – HBMECs) diferem das células endoteliais dos vasos sistêmicos. Segundo Jong e colaboradores (2001) a *C. albicans* é capaz de penetrar nestas células e de determinar a formação de pseudohifas em seu interior. Além disto, estes autores constataram que a *C. albicans* é capaz de atravessar estas células através de transcitose. A identificação de algumas moléculas que participam deste processo de migração foi recentemente descrita. Liu e colaboradores (2011) descreveram que a *C. albicans* infecta o cérebro ligando-se a gp96, uma proteína de choque térmico, expressa exclusivamente em HBMECs. Esta proteína é reconhecida pela Als3 (invasina fúngica) da *C. albicans*, o que permite a internalização do fungo pela célula endotelial e sua disseminação para o SNC.

### 1.3. Relação entre esclerose múltipla e fungos

A possibilidade de que toxinas fúngicas possam contribuir ou mesmo ser agentes causais da EM foi sugerida na década de 80, mas foi negligenciada durante vários anos. Recentemente, entretanto, este assunto foi alvo de revisão por Purzycki e Shain, (2010). Segundo esta revisão, certas espécies de fungos como *Aspergillus* e *Candida* conseguiriam evadir-se da resposta imunológica por se encontrarem revestidos com uma capa de manana. Esta característica lhes permitiria sobreviver no organismo humano, em um sítio não neurológico e liberar seus metabólitos continuamente para a corrente sanguínea. Entre estes produtos existem toxinas que são capazes de alterar a permeabilidade da BHE e atingir o SNC onde causariam degradação e liberação de componentes da bainha de mielina. É possível, portanto, hipotetizar que os autoantígenos assim liberados atinjam os órgãos linfoides secundários desencadeando uma resposta autoimune específica.

A possível contribuição de componentes fúngicos para o desenvolvimento da EM é sustentada tanto por achados em modelos experimentais como por algumas evidências observadas em pacientes com EM. Por exemplo, fumonisina B é uma micotoxina produzida pelo *Fusarium verticillioides*, comumente encontrado em produtos agrícolas e também em locais com excesso de umidade. Esta substância é tóxica para células da microglia e também para astrócitos primários obtidos de camundongos (Stockmann-Juvala & Savolainen, 2008). Além disto, esta toxina altera a síntese de esfingolipídeos. Coincidentemente, foi demonstrado que nos pacientes com EM ocorre uma mudança na composição lipídica dos neurônios caracterizada por aumento no conteúdo dos fosfolipídeos e diminuição na quantidade de esfingolipídeos (Wheeler et al., 2008). Do mesmo modo, experimentos realizados em ratos têm mostrado que a micotoxina penitrem A produzida pelo *Penicillium crustosum* causa tremores prolongados, ataxia, pseudoparalisia e grave disfunção neurológica (Cavanagh et al., 1998).

Outra toxina fúngica associada com alterações no SNC é a gliotoxina, um metabólito termo-estável produzido por várias espécies de *Aspergillus* e *Candida* (Kosalec & Pepeljnjak, 2005). A produção da gliotoxina por *Candida* vem sendo discutida. Kupfahl e colaboradores (2007) analisaram 100 isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida* e não constataram a produção de gliotoxina intracelular ou extracelular *in vitro*. Kosalec e colaboradores (2008) também não detectaram a produção de gliotoxina ou metabólitos similares em diferentes cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* cultivadas em meio sintético. Entretanto, alguns autores

sugerem a produção de gliotoxina ou gliotoxina-*like* por diferentes cepas de *Candida*. Shah e Larsen (1991) analisaram 50 cepas de *Candida* cultivadas durante sete dias e observaram que 32 cepas produziram uma substância semelhante à gliotoxina comercial, chamada de gliotoxina-*like*. Estes mesmos autores identificaram a gliotoxina em amostras vaginais de pacientes com candidíase vaginal e sugerem que a gliotoxina está relacionada à virulência de *C. albicans* (Shah et al, 1995). Esta virulência ocorreria devido aos efeitos tóxicos comprovados da gliotoxina e também pelo fato da gliotoxina afetar a capacidade de invasão e disseminação do fungo, exacerbando a infecção (Kosalec & Pepeljnjak, 2004).

A inoculação intraperitoneal de gliotoxina em ratos determina a morte apoptótica de astrócitos e oligodendrócitos (Willis et al., 2004). Evidência mais direta da participação da gliotoxina na patogênese da EM foi descrita por Ménard e colaboradores (1998). Estes autores constataram, inicialmente, que o líquido cérebro-espinhal destes pacientes, mesmo quando termo-inativados, causavam morte apoptótica de astrócitos e de oligodendrócitos, mas não de outros tipos celulares, como fibroblastos e células endoteliais. O fator envolvido nesta citotoxicidade seletiva foi identificado como sendo a gliotoxina. Esta atividade gliotóxica foi inclusive identificada na urina de pacientes com EM, tendo sido sugerido que sua detecção serviria como um marcador para acompanhar recidivas ou fazer correlação com a intensidade da doença (Malcus-Vocanson et al., 1998).

Trabalhos recentes reforçam a possível participação de *Candida* spp. na EM. Benito-León *et al.* (2010), mostraram uma associação significativa entre níveis de anticorpos séricos entre *Candida* e EM. No estudo de Pisa *et al.* (2011) foi constatada a presença de macromoléculas fúngicas, de B-1,3-glucana e de anticorpos anti-*Candida* no sangue periférico de um paciente com EM. Anticorpos específicos e antígenos de *Candida* também estavam presentes no líquido cefalorraquidiano deste indivíduo. Recentemente, estes autores comprovaram a presença de antígenos de *Candida* no líquido de vários pacientes com EM (Pisa et al, 2013). Apesar da relevância deste assunto, o mesmo não tem sido estudado de forma mais detalhada. Neste contexto, nossa proposta de trabalho é, em linhas gerais, investigar a relação da *C. albicans* com a EAE que é um modelo de EM.

#### 1.4. Relação entre esclerose múltipla e vitamina D

O tratamento para esclerose múltipla inclui medicamentos que visam reduzir a frequência e a gravidade das exacerbações, mas não ocorre cura da doença. Assim, em sua fase aguda, a EM é usualmente tratada com corticosteroides enquanto que em sua fase crônica utilizam-se drogas imunomoduladoras como o IFN- $\beta$  e o acetato de glatiramer (Gold & Wolinsky, 2010). Atualmente outras drogas têm sido associadas ao tratamento da EM, como mitoxantrone, fingolimod e natalizumab (Castro-Borrero et al, 2012). Dados gerais sobre os mecanismos de ação destas drogas são descritos na tabela 1. Além disso, um grande número de ensaios clínicos tem sido conduzido para avaliar a segurança e eficácia de novas drogas, incluindo alemtuzumab, fumarato de dimetila, laquinimod, rituximab, daclizumab e cladribina (Minagar, 2013).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a deficiência de vitamina D3 pode estar relacionada à etiologia da EM (Ascherio et al., 2012). Os trabalhos realizados por Munger e colaboradores mostraram que os níveis séricos de vitamina D3 (VitD) são significativamente menores em pacientes com EM em comparação com os níveis encontrados em indivíduos saudáveis. Recentemente foi demonstrado que a suplementação com VitD está associada com redução do risco de desenvolver a doença (Munger et al., 2004; Munger et al., 2006). Em um estudo clínico de fase 2 foram avaliados 49 pacientes com EM, sendo 25 tratados com altas doses de VitD durante 52 semanas (Burton et al, 2010). Neste estudo, não foram observados efeitos adversos relacionados às altas doses de VitD e os pacientes tratados apresentaram menor quantidade de recidivas da doença e redução na proliferação de linfócitos T em comparação com indivíduos controle (Burton et al, 2010).

Nos últimos anos nosso laboratório vem explorando o conceito de imunização tolerogênica profilática e terapêutica em modelos experimentais de artrite e EM. Temos seguido a linha de investigação que avalia a eficácia das imunizações diretas, ou seja, inteiramente *in vivo*, uma vez que estas estratégias poderiam ser mais facilmente traduzidas do modelo animal para o paciente. A substância de escolha é a VitD não só porque seus efeitos imunomoduladores estão bem estabelecidos mas também porque acredita-se que ela tenha um papel importante na redução do risco de desenvolver doenças autoimunes e infecciosas (Yin & Agrawal, 2014).

**Tabela 1.** Mecanismos de ação de drogas utilizadas no tratamento da esclerose múltipla.

| <b>Droga</b>  | <b>Mecanismo de ação</b>  | <b>Referência</b>                  |
|---|---|------------------------------------|
| <b>IFN-β1a/ IFN-β1b</b><br>(Avonex, Rebif, Betaseron) | <i>APCs</i> - diminui a apresentação de antígenos e a ativação de células T; <i>Células T</i> - diminui a produção de citocinas inflamatórias e determina expansão de células T reguladoras; <i>Células B</i> - diminui a expressão de MHC II e CD80, aumenta a produção de IL-10 e TGF-β.  | Kasper & Reder, 2014               |
| <b>Acetato de glatiramer</b><br>(Capoxone)            | <i>APCs</i> - compete pela ligação com o MHC II bloqueando a interação de antígenos da mielina com MHC II; <i>Células T</i> - diminui a expansão de Th17 e induz expansão de Th2 e células T reguladoras; <i>Células B</i> - aumenta a produção de anticorpos e citocinas anti-inflamatórias como a IL-10; <i>Células do SNC</i> - induz proliferação, migração e diferenciação de células neuronais progenitoras e oligodendrócitos, resultando em remielinização. | Aharoni, 2014                      |
| <b>Mitoxantrone</b><br>(Novantrone)                   | <i>Células T</i> - inibe a proliferação de células Th e a produção de citocinas inflamatórias; <i>Células B</i> - induz apoptose de células B.  | Minagar 2013                       |
| <b>Fingolimod</b><br>(FTY 720, Gilenya)               | <i>Células T</i> - impede a migração de células T autorreativas para o sangue periférico e também para o SNC; <i>Células do SNC</i> - induz migração e diferenciação de células neuronais progenitoras, proliferação de astrócitos e expansão de células progenitoras de oligodendrócitos, resultando em remielinização.  | Gajofatto <i>et al.</i> , 2015     |
| <b>Natalizumab</b><br>(Tysabri)                       | <i>Células T e B</i> - inibe a aderência e subsequente migração de linfócitos através da BHE, atenuando a inflamação do SNC.  | Salhofer-Polanyi & Leutmezer, 2014 |

Inicialmente a atividade biológica do hormônio  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (VitD; calcitriol) foi focada na regulação da homeostasia de cálcio e fósforo. Mas atualmente já se sabe que seus efeitos biológicos se estendem a diversos tipos celulares, como por exemplo, as células do sistema imunológico e do SNC (Kongsbak et al., 2013; Eyles et al., 2005). O papel da VitD nas imunidades inata e específica é mediado por via endócrina, ou seja, através do calcitriol circulante, por via parácrina (em células adjacentes ou próximas) e também por via autócrina (dentro da própria célula) (Lang et al., 2013). Este efeito tão amplo e relevante da VitD no sistema imune está relacionado com a existência de receptores para VitD (VDR) na maioria das células deste sistema (Wöbke et al., 2014). Além disso, o sistema imune é capaz de produzir a enzima 25-hidroxivitamina D- $1\alpha$ - hidroxilase que converte a forma circulante da vitamina D na forma ativa. Células típicas da imunidade inata tais como monócitos, macrófagos e DCs não só expressam VDR como também produzem a hidroxilase acima citada. De forma geral, a adição de VitD em monócitos/macrófagos resulta em diminuição da produção de derivados de  $\text{O}_2$ , de NO e das citocinas pró-inflamatórias (Neve et al., 2014; Jain, 2013). Acredita-se que esta inibição, que aparentemente contrasta com a atividade microbicida da VitD, seja um efeito de feedback negativo para manter a homeostase, ou seja, evitar uma resposta inflamatória excessiva. Foi recentemente demonstrado por Chen et al., 2013, que a sinalização via VDR atenua a inflamação mediada por receptores do tipo Toll em macrófagos.

Outra atividade relevante da VitD é a modulação de DCs e a indução de células T reguladoras (Tregs). DCs humanas diferenciadas na presença de calcitriol são imaturas e se caracterizam por expressão reduzida de CD1a, MHC II, CD40, CD80 e CD86 (Adorini & Penna, 2009). 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 DCs se tornam incapazes de estimular a proliferação de células T. Este fenômeno tem sido, pelo menos em parte, atribuído à geração de Tregs, pois a co-cultura de DCs pré-tratada com calcitriol e células T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  leva à indução de células Tregs  $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+$  (Penna et al., 2005). A VitD também atua sobre células T produtoras de IL-17. Hamzaoui e colaboradores (2014) demonstraram que a adição de VitD inibiu a diferenciação de células  $\text{TCD4}^+$  em células  $\text{TCD4}^+\text{IL-17}^+$  tanto em pacientes com asma quanto em controles normais. Seu efeito sobre células Th2 é menos claro, sendo que alguns relatos indicam aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (Boonstra et al., 2001; Sloka et al., 2011), enquanto outros mostram redução no número de células produtoras de IL-4 ou até mesmo ausência de efeito

(Dimeloe et al., 2010). A dependência das concentrações utilizadas *in vitro* tem sido apontada como causa destes resultados contraditórios.

Recentemente tem sido demonstrado o papel imunomodulador benéfico da VitD na EAE. Chang e colaboradores demonstraram que camundongos C57BL/6 tratados com VitD apresentaram melhora significativa na sintomatologia acompanhada de redução na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IFN- $\gamma$  e IL-22) (Chang et al., 2010). A administração de VitD ou a transferência adotiva de DCs imaturas induzidas pela VitD foram capazes de expandir a população de células Tregs reduzindo a gravidade da EAE (Farias et al., 2013). Também foi demonstrado em camundongos C57BL/6 que a suplementação de vitamina D determinou efeito profilático e terapêutico mediado pela IL-10 (Spach et al., 2006).

Dentro deste contexto, o aspecto mais inovador desta linha de pesquisa do laboratório é investigar se a VitD funciona como um adjuvante tolerogênico quando associada com antígenos específicos. O possível papel de drogas imunossupressoras como adjuvantes tolerogênicos só foi investigado mais recentemente. Kang et al. (2008), por exemplo, demonstraram que camundongos BALB/c sensibilizados com OVA poderiam ser dessensibilizados por um tratamento concomitante com um peptídeo de OVA e dexametasona. Este processo de tolerização foi associado com bloqueio na maturação de DCs e com expansão de Tregs FoxP3+. Estes autores também constataram que a dexametasona era tolerogênica e profilática em camundongos NOD quando associada com um peptídeo derivado de insulina. Kang et al. (2009) mostraram que este conceito também era válido na EAE. A imunização de camundongos com uma vacina gênica contendo o gene da MOG na presença de FK506 preveniu o desenvolvimento da EAE.

Nesta área de pesquisa mostramos recentemente que a inoculação, em camundongos C57BL/6, de MOG na presença de VitD, preveniu o desenvolvimento da EAE. Estes estudos geraram dois trabalhos, sendo um deles relativo ao efeito profilático (Mimura et al., 2016) e o outro relacionado com o efeito terapêutico (Chiuso-Minicucci et al., 2015).

## 1.5. Racional do projeto

A EM é uma doença autoimune grave que acomete o SNC. Acredita-se que fatores ambientais tais como agentes infecciosos possam agravar ou até mesmo desencadear esta patologia. Evidências observadas em pacientes e em modelos experimentais indicam que fungos podem contribuir com a patogênese da EM. Neste contexto, o objetivo deste projeto é avaliar o efeito da infecção com *C. albicans* e do contato com derivados fúngicos no desenvolvimento da EAE que é o modelo utilizado para estudos desta patologia.

Nossa hipótese de trabalho é que a infecção com *C. albicans* e o contato com derivados fúngicos agrave esta doença. Este possível agravamento ocorreria, por exemplo, pela presença de toxinas fúngicas na circulação que seriam capazes de alterar a permeabilidade da BHE e, assim, penetrar no SNC, causando lesão do tecido nervoso e liberação de autoantígenos. Alternativamente a presença do fungo ou dos antígenos no SNC seria capaz de determinar uma reação inflamatória específica para o fungo que contribuiria para a expressão clínica da EAE. Alternativa ou concomitantemente, a presença do fungo e/ou derivados fúngicos no SNC poderia contribuir com a liberação de neuroantígenos.

Considerando ainda a necessidade de estratégias mais específicas e que sejam eficazes mesmo na presença de outros fatores agravantes da EM como as infecções, por exemplo, objetivamos ainda investigar se o fungo interfere na eficácia profilática da associação de MOG com VitD.

*Referências*

## 2. Referências

- ADORINI, L.; PENNA, G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. **Hum Immunol.**, v. 70, p. 345–352, 2009.
- AHARONI, R. Immunomodulation neuroprotection and remyelination - the fundamental therapeutic effects of glatiramer acetate: a critical review. **J Autoimmun.**, v. 54, p. 81-92, 2014.
- ARENDRUP, M. C. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. **Dan Med J.**, v. 60, n. 11:B4698, 2013.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K.L.; LÜNEMANN, J.D. The initiation and prevention of multiple sclerosis. **Nat Rev Neurol.**, v. 8, p. 602–612, 2012.
- BENITO-LEÓN, J.; PISA, D.; ALONSO, R.; CALLEJA, P.; DÍAZ-SÁNCHEZ, M.; CARRASCO, L. Association between multiple sclerosis and *Candida* species: evidence from a case-control study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 29, p. 1139–1145, 2010.
- BERNARD, C. C.; JOHNS, T. G.; SLAVIN, A.; ICHIKAWA, M.; EWING, C.; LIU, J.; BETTADAPURA, J. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. **J Mol Med**, v. 75, p. 75:77-88, 1997.
- BOONSTRA, A.; BARRAT, F. J.; CRAIN, C.; HEATH, V. L.; SAVELKOUL, H. F.; O’GARRA, A. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. **J Immunol.**, v. 167, p. 4974–4980, 2001.
- BROWN, A. J. B.; GOW, N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 8, p. 333-338, 1999.
- BROWNE, P.; CHANDRARATNA, D.; ANGOOD, C.; TREMLETT, H.; BAKER, C.; TAYLOR, B. V.; THOMPSON, A. J. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology.**, v. 83, n. 11, p. 1022-1024, 2014.
- BURTON, J. M.; KIMBALL, S.; VIETH, R.; BAR-OR, A.; DOSCH, H. M.; CHEUNG, R.; GAGNE, D.; D’SOUZA, C.; URSELL, M.; O’CONNOR, P. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. **Neurology.**, v. 74, n. 23, p. 1852-1859, 2010.
- CASTRO-BORRERO. W.; GRAVES, D.; FROHMAN, T. C.; FLORES, A. B.; HARDEMAN, P.; LOGAN, D.; ORCHARD, M.; GREENBERG, B.; FROHMAN, E. M. Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review. **Ther Adv Neurol Disord.**, v. 5, n. 4, 205-220.
- CAVANAGH, J. B.; HOLTON, J. L.; NOLAN, C. C.; et al. The effects of the tremorgenic mycotoxin penitrem A on the rat cerebellum. **Vet Pathol.**, v. 35, p. 53–63, 1998.
- CHANG, J-H.; CHA, H-R.; LEE, D-S.; SEO, K.Y.; KWEON, M-N. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. **PLoS ONE.**, v. 5, e12925, 2010.
- CHEN, Y.; LIU, W.; SUN, T.; HUANG, Y.; WANG, Y.; DEB, D.K.; et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D promotes negative feedback regulation of TLR signaling via targeting microRNA-155-SOCS1 in macrophages. **J Immunol.**, v. 190, p. 3687–3695, 2013.

- CHIUSO-MINICUCCI, F.; ISHIKAWA, L.L.; MIMURA, L.A.; FRAGA-SILVA, T.F.; FRANÇA, T.G.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S.F.; et al. Treatment with Vitamin D/MOG Association Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **PLoS One.**, v. 10, e0125836, 2015.
- CONSTANTINESCU, C. S.; FAROOQI, N.; O'BRIEN, K.; GRAN, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **Br J Pharmacol.**, v. 164, n. 4, p. 1079-1106, 2011.
- CURTIS, M. M.; WAY, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, p. 177–185, 2009.
- DIMELOE, S.; NANZER, A.; RYANNA, K.; HAWRYLOWICZ, C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response-The role of glucocorticoids and Vitamin D. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 120, p. 86–95, 2010.
- D'OSTIANI, C. F.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. **J Exp Med.**, v. 191, p. 1661-1674, 2000.
- ELLOSO, M. M.; PHIEL, K.; HENDERSON, R. A.; HARRIS, H. A.; ADELMAN, S.J. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogenreceptor-selective ligand. **J Endocrinol**, v. 185, p. 243-252, 2005.
- EYLES, D.W.; SMITH, S.; KINOBE, R.; HEWISON, M.; MCGRATH, J.J. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. **J Chem Neuroanat.**, v. 29, p. 21–30, 2005.
- FAIX, R. G.; CHAPMAN, R. L. Central nervous system candidiasis in the high-risk neonate. **Semin Perinatol.** v. 27, p. 384-392, 2003.
- FARIAS, A.S.; SPAGNOL, G.S.; BORDEAUX-REGO, P.; OLIVEIRA, C.O.F.; FONTANA, A.G.M.; DE PAULA, R.F.O.; et al. Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. **CNS Neurosci Ther.**, v. 19, p. 269–277, 2013.
- FIDEL, P. L.; HUFFNAGLE, G. B. **Fungal Immunology: From an Organ Perspective.** New York: Springer Science, 2005. 506 p.
- FRAGA-SILVA, T. F.; VENTURINI, J.; DE ARRUDA, M. S. Trafficking of phagocytic peritoneal cells in hypoinsulinemic-hyperglycemic mice with systemic candidiasis. **BMC Infect Dis.**, v. 13, p. 147, 2013.
- FURUZAWA-CARBALLEDA, J.; VARGAS-ROJAS, M. I.; CABRAL, A. R. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. **Autoimmun Rev**, v. 6, p. 169-175, 2007.
- GAJOFATTO, A.; TURATTI, M.; MONACO, S.; BENEDETTI, M. D. Clinical efficacy, safety, and tolerability of fingolimod for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. **Drug Healthc Patient Saf.**, v. 7, p. 157-167, 2015.
- GOLD, R.; LININGTON, C.; LASSMANN, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. **Brain**, v. 129, p. 1953-1971, 2006.
- GOLD, R.; WOLINSKY, J. S. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. **Acta Neurol Scand.** 2010. doi:10.1111/j.1600-0404.2010.01444.x.

- HAMZAOU, A.; BERRAÏES, A.; HAMDI, B.; KAABACHI, W.; AMMAR, J.; HAMZAOU, K. Vitamin D reduces the differentiation and expansion of Th17 cells in young asthmatic children. **Immunobiology.**, v. 219, p. 873–879, 2014.
- HOHLFELD, R. Multiple sclerosis: Human model for EAE? **Eur J Immunol**, v. 39, p. 1991-2058, 2009.
- IMITOLA, J.; CHITNIS, T.; KHOURY, S. J. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. **Pharmacol Ther**, v. 106, p. 163-77, 2005.
- JAIN, S.K.; MICINSKI, 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.**, n. 437, p. 7–11, 2013.
- JONG, A. Y.; STINS, M. F.; HUANG, S. H.; CHEN, S. H.; KIM, K. S. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. **Infect Immun.** v. 69, p. 4536-4544, 2001.
- KANG, Y.; XU, L.; WANG, B.; CHEN, A.; ZHENG, G. Cutting edge: Immunosuppressant as adjuvant for tolerogenic immunization. **J Immunol.**, v. 180, p. 5172–1576, 2008.
- KANG, Y.; ZHAO, J.; LIU, Y.; CHEN, A.; ZHENG, G.; YU, Y.; et al. FK506 as an adjuvant of tolerogenic DNA vaccination for the prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Gene Med.**, v. 11, p. 1064–1070, 2009.
- KASPER, L. H.; REDER, A. T. Immunomodulatory activity of interferon-beta. **Ann Clin Transl Neurol.**, v. 1, n. 8, p. 622-631, 2014.
- KONGSBAK, M.; LEVRING, T.B.; GEISLER, C.; VON ESSEN, M.R. The vitamin d receptor and T cell function. **Front Immunol.**, n. 4, p. 148, 2013.
- KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S. Chemistry and biological effects of gliotoxin. **Arh Hig Rada Toksikol.**, v. 55, n. 4, p. 313-320, 2004.
- KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S. Mycotoxigenicity of clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* isolates, **Acta Pharm.**, v. 55, p. 365–375, 2005.
- KOSALEC, I.; PUEL, O.; DELAFORGE, M.; KOPIAR, N.; ANTOLOVIC, R.; JELIC, D.; MATICA, B.; GALTIER, P.; PEPELJNJAK, S. Isolation and cytotoxicity of low-molecular-weight metabolites of *Candida albicans*. **Front Biosci.**, v. 1, n. 13, p. 6893-6904, 2008.
- KUNDU, G.; NOVERR, M. C. Exposure to host or fungal PGE2 abrogates protection following immunization with *Candida*-pulsed dendritic cells. **Med Mycol**, v. 49, n. 4, p. 380-394, 2011.
- KUPFAHL C, RUPPERT T, DIETZ A, GEGINAT G, HOF H. *Candida* species fail to produce the immunosuppressive secondary metabolite gliotoxin in vitro. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, n. 6, p. 986-992, 2007.
- LANG, P.O.; SAMARAS, N.; SAMARAS, D.; ASPINALL, R. How important is vitamin D in preventing infections? **Osteoporos Int.**, v. 24, p. 1537–1553, 2013.
- LINK H, XIAO B. Rat models as tool to develop new immunoterapies. **Immunol Rev**, v. 184, p. 117-128, 2001.

- LIONAKIS, M. S.; LIM, J. K.; LEE, C. C.; MURPHY, P. M. Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. **J Innate Immun.**, v. 3, n. 2, p. 180-199, 2011.
- LIU, Y.; MITTAL, R.; SOLIS, N. V.; PRASADARAO, N. V.; FILLER, S. G. Mechanisms of *Candida albicans* trafficking to the brain. **PLoS Pathog.** v. 7, n. 10, p. e1002305, 2011.
- LUCCHINETTI, C.; BRÜCK, W.; PARISI, J.; SCHEITHAUER, B.; RODRIGUEZ, M.; LASSMANN, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implication for the pathogenesis of demyelination. **Ann Neurol**, v. 47, p. 707-717, 2000.
- MALCUS-VOCANSON, C.; GIRAUD, P.; BROUSSOLLE, E.; PERRON, H.; MANDRAND, B.; CHAZOT, G. A urinary marker for multiple sclerosis. **Lancet**, v. 351, p. 1330, 1998.
- MÉNARD, A.; AMOURI, R.; DOBRANSKY, T.; et al. A Gliotoxic Factor in Multiple Sclerosis. **J Neurol Sci.**, v. 154, p. 209-222, 1998a.
- MIMURA, L.A.N.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; FRAGA-SILVA, T.F.C.; GONÇALVES ZORZELLA-PEZAVENTO, S.F.; FRANÇA, T.G.D.; ISHIKAWA, L.L.W.; et al. Association of myelin peptide with vitamin D prevents autoimmune encephalomyelitis development. **Neuroscience**, v. 317, p. 130-140, 2016.
- MINAGAR, A. Current and future therapies for multiple sclerosis. **Scientifica (Cairo)**, 2013: 249101.
- MUNGER, K.L.; ZHANG, S.M.; O'REILLY, E.; HERNÁN, M.A.; OLEK, M.J.; WILLETT, W.C.; et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. **Neurology**, v. 62, p. 60-65, 2004.
- MUNGER, K.L.; LEVIN, L.I.; HOLLIS, B.W.; HOWARD, N.S.; ASCHERIO, A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. **JAMA**, v. 296, p. 2832-2838, 2006.
- MURPHY, A.C.; LALOR, S.J.; LYNCH, M.A.; MILLS, K.H.G. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain Behav Immun.**, v. 24, n. 4, p. 641-651, 2010.
- NETEA, M.G.; STUYT, R.J.; KIM, S.H.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J.; DINARELLO, C.A. The role of endogenous interleukin (IL)-18, IL-12, IL-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the production of interferon- $\gamma$  induced by *Candida albicans* in human whole-blood cultures. **J Infect Dis.**, 185:963-970, 2002.
- NETEA, M. G.; GOW, N. A. R.; MUNRO, C. A.; et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1642-1650, 2006.
- 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.**, v. 14, p. 275-283, 2014.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBO'N, A. M.; RESTREPO, A.; AND COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.
- PENNA, G.; RONCARI, A.; AMUCHASTEGUI, S.; DANIEL, K.C.; BERTI, E.; COLONNA, M.; et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is

- dispensable for induction of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Blood.**, v. 106, p. 3490–3497, 2005.
- PARKER, J. C. JR.; MCCLOSKEY, J. J.; LEE, R. S. Human cerebral candidosis--a postmortem evaluation of 19 patients. **Hum Pathol.**, n. 2, v. 1, p. 23-28, 1981.
- PISA, D. & ALONSO, R. & CARRASCO, L. Fungal infection in a patient with multiple sclerosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, DOI 10.1007/s10096-011-1206-1, 2011.
- PISA, D.; ALONSO, R.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F. J.; CARRASCO, L. Fungal infection in cerebrospinal fluid from some patients with multiple sclerosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 32, n. 6, p. 795-801, 2013.
- PURZYCKI, C. B.; SHAIN, D. H. Fungal toxins and multiple sclerosis: a compelling connection. **Brain Res Bull**, v. 82, n. 1–2, p. 4–6, 2010.
- ROMAGNOLI, G.; NISINI, R.; CHIARI, P.; *et al.* The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. **J Leukoc Biol.**, v. 75, p. 117-126, 2004.
- SAIJO, S. AND IWAKURA, Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. **International Immunology**, 2011, p. 1-6. doi:10.1093/intimm/dxr046.
- SALHOFER-POLANYI, S.; LEUTMEZER, F. Contemporary treatment options for relapsing-remitting multiple sclerosis. **Drugs Today (Barc).**, v. 50, n. 5, p. 365-383, 2014.
- SCHUIT, K. E. Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeasts by human monocytes and neutrophils. **Infect. Immun.**, v. 24, p. 932-938, 1979.
- SHAH, D. T.; LARSEN, B. Clinical isolates of yeast produce a gliotoxin-like substance. **Mycopathologia.**, v. 116, n. 3, p. 203-208, 1991.
- SHAH, D. T.; GLOVER, D. D.; LARSEN, B. In situ mycotoxin production by *Candida albicans* in women with vaginitis. **Gynecol Obstet Invest.**, v. 39, n. 1, p. 67-69, 1995.
- SILBERBERG, D. H. Doenças Desmielinizantes. In: Wyngaarden, J.B.; Smith, L. H.; Bennett, J.C. (19 ed.) **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro, 1992. p. 2243-49.
- SLOKA, S.; SILVA, C.; WANG, J.; YONG, V.W. Predominance of Th2 polarization by vitamin D through a STAT6-dependent mechanism. **J Neuroinflammation.**, v. 8, p. 56, 2011.
- SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 683-747, 2005.
- SPACH, K.M.; NASHOLD, F.E.; DITTEL, B.N.; HAYES, C.E. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol.**, n. 177, p. 6030–6037, 2006.
- STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. **Human & experimental toxicology**, v. 27, n. 11, p. 799-809, 2008.
- SUNDQVIST, E.; SUNDSTRÖM, P.; LINDÉN, M.; HEDSTRÖM, A. K.; ALOISI, F.; HILLERT, J.; KOCKUM, I.; ALFREDSSON, L.; OLSSON, T. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. **Genes Immun.**, 2011. doi: 10.1038/gene.2011.42.

- TAIT, A. R.; STRAUS, S. K. Phosphorylation of U24 from Human Herpes Virus type 6 (HHV-6) and its potential role in mimicking myelin basic protein (MBP) in multiple sclerosis. **FEBS Lett.**, v. 582, n. 18, p. 2685-2688, 2008.
- VAN DE VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J. Novel strategies for the prevention and treatment of *Candida* infections: the potential of immunotherapy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1063–1075, 2010.
- VAN DER GRAAF, C. A.; NETEA, M. G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. **Infect Immun.**, v. 73, p. 7458-7464, 2005.
- VARRIALE, S.; BÉRAUD, E.; BARBARIA, J.; GALIBERT, R.; BERNARD, D. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of adoptive experimental autoimmune encephalomyelitis by 'recovery-associated suppressor cells'. **J Neuroimmunol**, v. 53, p. 123-131, 1994.
- WHEELER, D.; BANDARU, V. V. R.; CALABRESI, P. A.; NATHAND, A.; HAUGHEY, N. J. A defect of sphingolipid metabolism modifies the properties of normal appearing white matter in multiple sclerosis. **Brain.**, 131, p. 3092-3102, 2008.
- WILLIS, C. L.; LEACH, L.; CLARKE, G. J.; NOLAN, C. C.; RAY, D. E. Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss. **Glia**, v. 48, n. 1, p. 1-13, 2004.
- WÖBKE, T.K.; SORG, B.L.; STEINHILBER, D. Vitamin D in inflammatory diseases. **Front Physiol.**, v. 5, p. 244, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION [internet]. Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008. **Geneva: WHO;** 2008. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563758\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563758_eng.pdf)
- YIN, K.; AGRAWAL, D.K. Vitamin D and inflammatory diseases. **J Inflamm Res.**, v. 7, p. 69–87, 2014.
- YAMPOLSKY, C.; CORTI, M.; NEGRONI, R. Fungal cerebral abscess in a diabetic patient successfully treated with surgery followed by prolonged antifungal therapy. **Rev Iberoam Micol.**, v. 27, n. 1, p. 6-9, 2010.

*Conclusões*

## 5. Conclusões

- I. A infecção sistêmica prévia por *C. albicans* antecipou e agravou os sinais clínicos da encefalomielite autoimune experimental (EAE). Este agravamento foi associado com disseminação do fungo para o sistema nervoso central (SNC) e intensificação da resposta autoimune, tanto na periferia quanto no SNC.
- II. A inoculação sistêmica de derivados fúngicos desencadeou efeito deletério ou protetor que dependeu da identidade do componente fúngico. A administração de gliotoxina resultou no agravamento da EAE que foi concomitante com aumento de infiltrado inflamatório e maior produção de TNF- $\alpha$  no SNC. Este agravamento também pode estar associado com permeabilização da barreira hematoencefálica e/ou efeito citotóxico direto da gliotoxina em células do SNC. Distintamente, a administração de leveduras mortas de *C. albicans* determinou um efeito protetor provavelmente associado com a migração, para o SNC, de células Th2 específicas para *C. albicans*.
- III. O efeito profilático da associação de um antígeno da mielina com vitamina D foi eficaz mesmo em animais com doença agravada pela infecção por *C. albicans*, indicando que o expressivo agravamento causado pelo fungo não quebrou a tolerância determinada pela vacinação.

O presente estudo contribuiu para o esclarecimento da participação de fatores ambientais na etiologia da esclerose múltipla, mostrando que derivados fúngicos podem agravar ou proteger contra o desenvolvimento da EAE que é o modelo experimental para estudo desta doença humana. Esta abordagem sugere que o assunto é complexo e que merece uma investigação aprofundada no sentido de revelar quais derivados fúngicos agravam a doença e quais têm potencial protetor.