

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CISTEÍNA SELENIZADA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA

JULIANA HELENA DOS SANTOS DE TOLEDO

ORIENTADORA: ALEXANDRINA SARTORI

COORIENTADORA: SOFIA FERNANDA GONÇALVES ZORZELLA PEZAVENTO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração Biologia de
microorganismos

Alexandrina Sartori

BOTUCATU – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Toledo, Juliana Helena dos Santos de.

Potencial terapêutico de cisteína selenizada em modelo experimental de esclerose múltipla / Juliana Helena dos Santos de Toledo. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Coorientador: Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella
Pezavento

Capes: 20100000

1. Cisteína. 2. Encefalomielite autoimune experimental.
3. Microglia. 4. Selênio na nutrição humana.

Palavras-chave: Cisteína selenizada; Encefalomielite autoimune experimental; Inflamassoma; Microglia; Selênio.

Agradecimentos

À UNESP e ao Programa de Pós graduação de Biologia Geral pela oportunidade de desenvolver meu mestrado.

Ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Microbiologia e Imunologia por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo suporte acadêmico e técnico.

À CAPES pela bolsa, que me permitiu desenvolver meu mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio 2016/23318-8 e ao CNPQ pelo auxílio 307269/2017-5.

À seção de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pelo suporte técnico, em especial ao Davi Muller, sempre disposto a orientar sobre questões normativas da pós graduação.

Aos laboratórios com que realizamos cooperações, pela boa vontade no auxílio com as metodologias que não puderam ser realizadas em nosso laboratório.

À Biorigin, em nome de Carlos Alberto Ferreira de Oliveira pela parceria, auxílio e produtos que tornaram este trabalho possível.

Aos animais que deram sua vida para que este trabalho fosse realizado, pois todo meu esforço não seria nada sem eles.

À minha orientadora, Dra Alexandrina Sartori por toda orientação, confiança e dedicação. Muito obrigada por tudo.

À minha coorientadora Sofia Zorzella-Pezavento por toda orientação, carinho, dedicação e amizade, sempre me guiando e me ensinando por todo este processo.

Às meninas do laboratório de Vacinas e Imunomodulação, Patrícia Borim, Karen Pinke, Luiza Mimura, Larissa Ragozo, Thais Fraga-Silva, Marcelo Sanches, Evelyn de Oliveira, Larissa Lumi e Natália Muñoz por todo companheirismo e auxílio teórico e prático, indispensável para este trabalho.

Ao Dr. Eduardo Bagagli, Dr. Luís Antonio Justulin Júnior e a Dra. Karen Henriette Pinke pela valiosa colaboração durante o exame de qualificação.

Aos meus amigos do Programa de mestrado, por toda a amizade e parceria nas disciplinas durante o mestrado.

Aos meus amigos por todo amor e paciência comigo durante todos estes anos.

À Amanda Pacheco, Beatriz Kimura, Nathan Oliveira, Júlia Faustini e Francielle Rocha, por todo amor e apoio, por cuidarem de mim durante todo meu mestrado, perto ou longe.

À minha família, por todo amor, carinho e por sempre me estimular a seguir meus sonhos.

Aos meus avós, Vicente, Maria Rita e Alberto, que não estão mais entre nós, mas estão sempre em meu coração.

À minha avó Erminda, que sempre me fez acreditar que eu poderia fazer qualquer coisa.

À minha tia Maria Célia e meus primos Fabiola e Paulo Henrique, por todo amor e por sempre cuidarem de mim.

Ao meu cunhado Alexandre por todo o amor, carinho e acolhida durante as viagens para congressos.

À minha irmã Natália, por todo amor e carinho, que sempre me apoiou e por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditei.

Aos meus irmãos Paulo Henrique e Pedro por todo o amor.

Ao meu pai Paulo, por todo amor e carinho, sempre me apoiando durante toda minha vida.

A minha mãe Lúcia, por todo amor, carinho e apoio nas minhas decisões na minha vida.

À Deus por todas as bênçãos que eu tenho na minha vida.

Índice

Resumo.....	8
Abstract	10
Introdução.....	12
Racional.....	19
Objetivos	22
Materiais e Métodos	24
Resultados	34
Discussão.....	49
Conclusão	53
Referências	55
Apêndices	62

Resumo

Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). A imunopatogênese da EM envolve linfócitos Th1, Th17 e Tc autorreativos e ativação de macrófagos e microglia, os quais liberam vários mediadores pró-inflamatórios e radicais livres. Não há cura para a EM e as terapias disponíveis desencadeiam efeitos colaterais. Neste contexto, testamos o potencial terapêutico da cisteína selenizada (CS), um produto em desenvolvimento pela empresa Biorigin, no controle da encefalomielite autoimune experimental (EAE). O potencial profilático/terapêutico foi testado por administração de CS durante 30 dias (14 dias antes seguido de 16 dias pós-indução da EAE) e o potencial terapêutico por administração da CS a partir de 1 ou 7 dias após a indução da doença. Os 3 procedimentos reduziram escore clínico e incidência da EAE. A estratégia profilática/terapêutica reduziu discretamente a expressão de componentes do inflamassoma NLRP3 e o percentual de macrófagos e microglia ativada no SNC. As duas estratégias terapêuticas determinaram redução significativa no escore clínico, no percentual de macrófagos e microglia ativada e na expressão de MHCII por estas células. A terapia com CS também reduziu a ativação do inflamassoma NLRP3 e a expressão de mRNA para iNOS e CX3CR1. A redução na percentagem de células dendríticas ativadas (DCs) (CD11b⁺MHCII⁺) e o aumento no percentual de DCs tolerogênicas (CD11b⁻CD103⁺) sugere o estabelecimento de um perfil regulador neste local. Nos linfonodos inguinais foi detectado um aumento discreto na expressão dos fatores de transcrição Foxp3, Tbet e GATA-3. Estes efeitos protetores foram concomitantes com níveis elevados de selênio no SNC. Ensaio de função renal e hepática sugerem que esta eficácia terapêutica não é acompanhada de efeitos colaterais. Para reforçar a possibilidade de translação dos resultados descritos no modelo para a doença humana, testamos a eficácia terapêutica da CS em camundongos SJL/J, os quais desenvolvem uma doença do tipo remitente-recorrente. O efeito foi similar ao descrito no modelo C57BL/6. Os resultados observados reforçam nossa hipótese de que este produto tem potencial para ser utilizado como terapia adjunta em pacientes com EM.

Palavras-chave: encefalomielite autoimune experimental, selênio, cisteína selenizada, inflamassoma, microglia.

Abstract

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Its immunopathogenesis is complex and involves the interplay of distinct autoreactive T lymphocyte subsets and innate immune cells. The persistent inflammation observed in MS patients is related to oxidative stress and inflammasome activation which have been recently implicated in both, demyelination and axonal damage processes. Since the development of new therapeutic procedures remains necessary, we evaluated the efficacy of an antioxidant product to control experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) development. The selenized cysteine (SC) is an organic selenium, developed by a Brazilian company (Biorigin). For prophylactic-therapeutic strategy, oral treatment with SC (45µg of selenium/dose) started 14 days before EAE induction and was daily extended until the acute phase of the disease. The precocious and delayed therapies have begun 1 or 7 days after MOG administration. The three therapeutic approaches reduced EAE incidence and clinical manifestations. Prophylactic-therapeutic strategy attenuated NLRP3 inflammasome activation and reduced the number of macrophages and activated microglia in the CNS. Precocious and delayed therapies were efficient in controlling EAE symptoms, reducing the percentage of macrophages and activated microglia and the MHCII expression. This protection was concomitant by less NLRP3 inflammasome activation and lower expression of mRNA for iNOS and CX3CR1. Reduction in the percentage of activated dendritic cells (DCs) (CD11b⁺MHCII⁺) and increase in the percentage of tolerogenic DCs (CD11b⁻CD103⁺) in the mesenteric lymph nodes suggest the presence of regulatory condition. Oral SC administration also slightly increase the expression of transcriptional factors Foxp3, Tbet and GATA-3 in inguinal lymph nodes. As elevated levels of selenium were determined in the CNS, we believe that SC could act directly in the neuroinflammation control. Hepatic and renal enzymes evaluation suggest that this product is safe for use. To reinforce the possibility to translate this treatment to MS patients, we evaluated SC therapeutic efficacy in a relapsing-remitting EAE model. Indeed, SC efficiently controlled the clinical manifestations in SJL/J mice. Our results emphasize that this organic selenium source has the potential to be used as an adjuvant therapy for MS patients.

Key-words: experimental autoimmune encephalomyelitis, selenium, selenized cysteine, inflammasome, microglia.

Introdução

Introdução

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica inflamatória e desmielinizante (GHASEMI; RAZAVI; NIKZAD, 2017), que afeta 2,5 milhões de pessoas no mundo, especialmente jovens adultos e que pode determinar incapacidade física e neurológica(DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; DENDROU; FUGGER, 2017). Sua maior prevalência ocorre na Europa e na América do Norte, principalmente em mulheres(BROWNE et al., 2014) e causa um grande impacto socioeconômico pois pode desencadear danos graves em jovens adultos na idade média dos 30 anos que estão constituindo família e construindo carreiras(DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; DENDROU; FUGGER, 2017).

É uma condição heterogênea e os sintomas podem incluir fraqueza de um ou mais membros, perda da visão, falta de coordenação motora e parestesia, distúrbios sensoriais e visuais, incontinência, fadiga, depressão e dor(HOHLFELD, 2009; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; DENDROU; FUGGER, 2017).Sua etiologia não é elucidada, mas sabe-se que é uma doença complexa e multifatorial que depende da constituição genética, desregulação do sistema imunológico e fatores ambientais(DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Quatro tipos de EM são descritos: remitente-recorrente, secundária progressiva, primária-progressiva e progressiva-recorrente. O diagnóstico é muitas vezes dificultado devido à falta de especificidade dos sintomas que variam nos diferentes pacientes e que muitas vezes são semelhantes aos encontrados em outras patologias(DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). A maioria dos pacientes apresenta inicialmente um quadro transitório de sintomas com períodos de exacerbação e remissão da doença, seguido por fase secundária progressiva, que é caracterizada por perdas irreversíveis e neurodegeneração (HOHLFELD, 2009; FLETCHER et al., 2010).

Acredita-se que o início da doença ocorra por ativação de linfócitos T autorreativos específicos para mielina em órgãos linfoides secundários, por mimetismo molecular ou de forma não específica por “bystander activation”. Estes linfócitos migram para o sistema nervoso central (SNC) onde são reativados por reconhecimento de autoantígenos, iniciando assim o processo de lesão inflamatória autoimune(SOSPEDRA; MARTIN, 2005; BUC, 2013; HARTUNG et al., 2014a; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Classicamente, células Th1 e Tc específicas para antígenos do SNC têm sido associadas a esta patologia(SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Entretanto, publicações posteriores indicam que células Th17 também desempenham um papel importante na patogênese da EM contribuindo, entre outros efeitos, para a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE)(PERON et al., 2010; WOJKOWSKA et al., 2014). Ênfase especial

também tem sido dada à participação de células T reguladoras (Tregs), visto que deficiências numéricas e funcionais têm sido descritas em pacientes com EM(KOUCHAKI et al., 2014). Uma visão geral da imunopatogênese encontra-se esquematizada na Figura A.

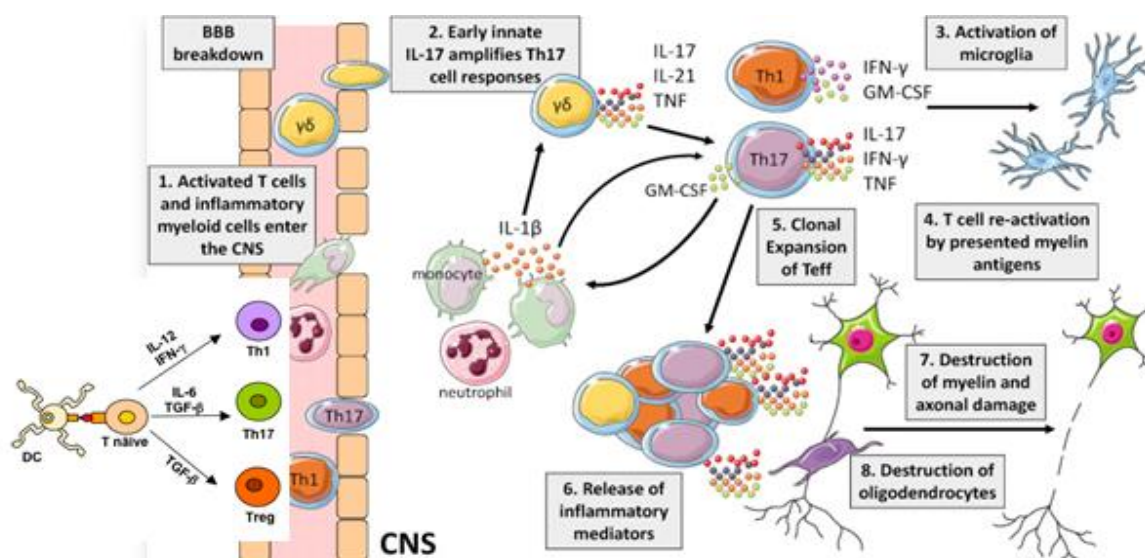


Figura A- Visão geral da imunopatogênese da EM. Células T são ativadas na periferia e migram, juntamente com células mieloides, para o SNC através da BHE. No SNC ocorrem várias etapas de ativação incluindo a amplificação da resposta Th17, ativação da microglia, reativação de células T por reconhecimento de antígenos da mielina e expansão clonal. Juntos estes processos determinam elevada produção de vários mediadores, incluindo citocinas e radicais livres, que destroem a bainha de mielina. (MCGINLEY et al., 2018 modificada)

Tratamentos para a EM são baseados principalmente em drogas imunomoduladoras visando redução da gravidade e da frequência de recidivas, uma vez que não há cura para a doença(DAMAL; STOKER; FOLEY, 2013). Os corticosteroides são geralmente utilizados na fase aguda da doença e as drogas imunomoduladoras, como o IFN- β e o acetato de glatiramer, são utilizadas em pacientes com quadros de exacerbação e remissão da doença(RUDICK et al., 2006; GOLD; WOLINSKY, 2011). Esses dois medicamentos impedem a ativação, a proliferação e a migração de células inflamatórias para o SNC (GOLD; WOLINSKY, 2011). Pacientes que não respondem bem a essa primeira linha de tratamento são submetidos ao uso do natalizumabe, um anticorpo monoclonal que se liga a cadeia $\alpha 4$ da integrina VLA-4, inibindo a adesão entre linfócitos e células endoteliais dos vasos sanguíneos no SNC, reduzindo assim o

tráfego de linfócitos através da BHE (POLMAN et al., 2006). O fingolimode, outro fármaco utilizado, determina sequestro dos linfócitos nos órgãos linfoides secundários atuando sobre o receptor para esfingosina-1-fosfato. Essa terapia por via oral é capaz de limitar o infiltrado inflamatório no SNC por impedir a migração de linfócitos ativados e também por possuir um efeito neuroprotetor direto nas células do SNC (AKTAS et al., 2010; SLOWIK et al., 2015). De forma geral, estas terapias são de custo elevado e não são completamente eficazes, pois além do fato de alguns pacientes não responderem aos tratamentos disponíveis, os mesmos são baseados na inibição global da resposta imune aumentando assim a suscetibilidade aos agentes infecciosos (HACKSTEIN; THOMSON, 2004; FLETCHER et al., 2010). Nesse contexto, novas terapias vêm sendo investigadas na tentativa de diminuir os efeitos colaterais (HAIDER et al., 2011).

Como o acesso às amostras biológicas de pacientes com EM é limitado, especialmente as biópsias de tecido do SNC, o modelo animal denominado encefalomielite autoimune experimental (EAE) é uma alternativa bastante empregada para estudar vários aspectos da EM (GHASEMI; RAZAVI; NIKZAD, 2017). A EAE é uma doença desmielinizante do SNC que tem similaridades clínicas e histopatológicas com a doença humana. A EAE é induzida por imunização via subcutânea com antígenos oriundos do SNC emulsificados com adjuvante completo de Freund e *Mycobacterium tuberculosis*. Duas doses de toxina pertussis por via peritoneal são necessárias para aumentar a permeabilidade da BHE em alguns modelos murinos (FLETCHER et al., 2010; GHASEMI; RAZAVI; NIKZAD, 2017).

A patogênese da EM é complexa e acredita-se que o início das lesões seja decorrente da ativação da resposta imune inata, destacando-se as células da microglia e os macrófagos. Estudos sugerem que os fagócitos internalizam e degradam a bainha de mielina, dando início ao processo inflamatório e desmielinizante (LUCCHINETTI et al., 2000; HAIDER et al., 2011). Estudos indicam que o estresse oxidativo é um fator crucial na iniciação e na perpetuação dos mecanismos envolvidos na patogênese da EM e na neurodegeneração, sendo observado um aumento de radicais livres e uma diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes em pacientes em comparação com indivíduos saudáveis (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004; CARDOSO et al., 2015). As espécies reativas de oxigênio (EROS) podem ser formadas nas células durante os processos oxidativos, principalmente na cadeia respiratória através do transporte mitocondrial de elétrons sendo que sua produção excessiva determina um desequilíbrio, gerando o que se denomina estresse oxidativo (JOHANSEN et al., 2005;

HAIDER et al., 2011), capaz de oxidar vários componentes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, provocando alterações estruturais e funcionais (RAMESH; PUGALENDI, 2005; LOPES; OLIVEIRA; SOARES FORTUNATO, 2008). As EROS são particularmente ativas no SNC, principalmente quando há uma diminuição dos níveis de antioxidantes neste tecido e um aumento das EROS que promovem dano direto ou indireto na BHE e na mielina (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004; HAIDER et al., 2011; CARDOSO et al., 2015). A microglia ativada e os macrófagos infiltrantes liberam vários mediadores pró-inflamatórios e radicais livres como superóxido, hidroxil, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (COLTON; GILBERT, 1993). A participação do estresse oxidativo na patogênese da EM está ilustrada na Figura B.

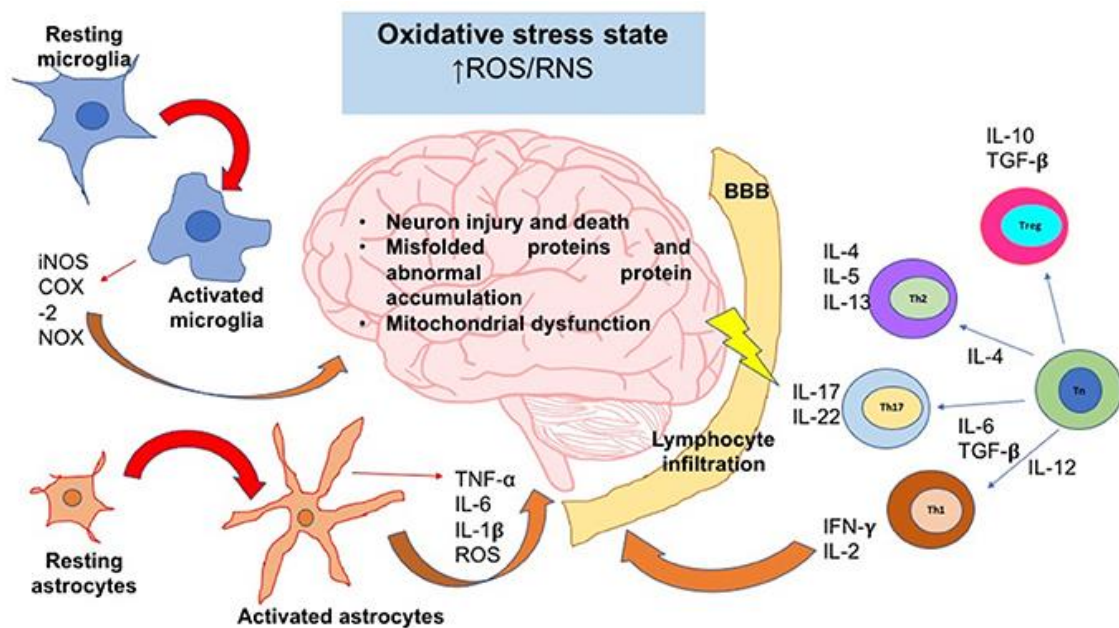


Figura B- Indução de neuroinflamação e neurodegeneração pelo estresse oxidativo. Em uma condição de estresse oxidativo, as espécies reativas do oxigênio (EROS) e as espécies reativas do nitrogênio (ERN) estão aumentadas e podem ativar microglia e astrócitos. Estas células secretam fatores pró-inflamatórios que reforçam o processo neuroinflamatório. Por outro lado, citocinas periféricas e fatores secretados pelo SNC aumentam a permeabilidade da BHE, permitindo a entrada de linfócitos T e outras células no SNC, os quais determinam neurodegeneração (SOLLEIRO-VILLAVICENCIO; RIVAS-ARANCIBIA, 2018).

O estresse oxidativo também está diretamente associado com um sistema denominado inflamassoma, um complexo proteico macromolecular composto por um sensor molecular, a

proteína adaptadora ASC e a protease caspase-1. O inflamassoma é ativado em resposta às infecções, dano tecidual ou desequilíbrios metabólicos, ativando programas celulares responsáveis pela maturação e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-18 e IL-33 (MARTINON et al., 2002; MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011). Os sensores moleculares do inflamassoma pertencem à família de receptores celulares denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que identificam estruturas de patógenos ausentes nas células dos mamíferos, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (AKIRA; UEMATSU, 2006), assim como padrões moleculares associados a dano (DAMPs) que são produzidos durante a lesão de tecidos. Entre os receptores celulares destacam-se os receptores do tipo Toll (TLRs), usualmente expressos na membrana celular e os receptores de ligação a nucleotídeos (NLR). Através destes receptores, as células são capazes de regular fagocitose, ativação celular e atividade microbicida, produção de citocinas e estresse oxidativo, criando um elo entre a imunidade inata e a adaptativa (AKIRA; UEMATSU, 2006; SINGHAL et al., 2014). Dentre os PRRs, se destacam os receptores NLRs (receptores de ligação a nucleotídeo contendo domínio com sequência repetida de resíduos do aminoácido leucina), sensores citoplasmáticos que reconhecem PAMPs e DAMPs, monitorando desse modo compartimentos intracelulares e extracelulares para sinais de infecção ou dano (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). As classes mais extensivamente estudadas de NLRs são os NLRs formadores de inflamassoma, como o AIM2, NLRC4, NLRC5, NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7 e NLRP12 (SHAO et al., 2015). O inflamassoma NLRP3 é o que se encontra melhor descrito até o momento e está amplamente associado às doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; WEN; TING; O'NEILL, 2012). Para ativação de NLRP3 e formação do inflamassoma são necessários dois sinais, sendo que o sinal 1 ou *priming* é desencadeado pela ativação do NF- κ B por TLRs, NLRs e receptores de citocinas, resultando na transcrição de NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18 (BAUERNFEIND et al., 2009). O segundo sinal é desencadeado por vários outros componentes, como efluxo de potássio (K⁺) (MUNÕZ-PLANILLO et al., 2013), influxo de cálcio intracelular (SHAO et al., 2015), translocação mitocondrial (MISAWA et al., 2013), produção de EROs, liberação de DNA mitocondrial e DAMPs (ZHOU et al., 2011). Com estes dois sinais, forma-se o complexo inflamassoma constituído pela associação de NLRP3, pró-caspase-1 e ASC. Este complexo desencadeia a transformação da procaspase-1 em caspase-1, que cliva a próIL-1 β e a próIL-18 em IL-1 β e IL-18, citocinas pró-inflamatórias que serão secretadas, aumentando a resposta inflamatória (SHAO et al., 2015). Um esquema geral dos sinais e das etapas envolvidos na ativação do

inflamassoma encontra-se delineado na Figura C. Como o estresse oxidativo está ligado a ativação do inflamassoma, o que causa um aumento na inflamação na EM (MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011; SHAO et al., 2015), o equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes torna-se essencial (RAMESH; PUGALENDI, 2005; LOPES; OLIVEIRA; SOARES FORTUNATO, 2008).

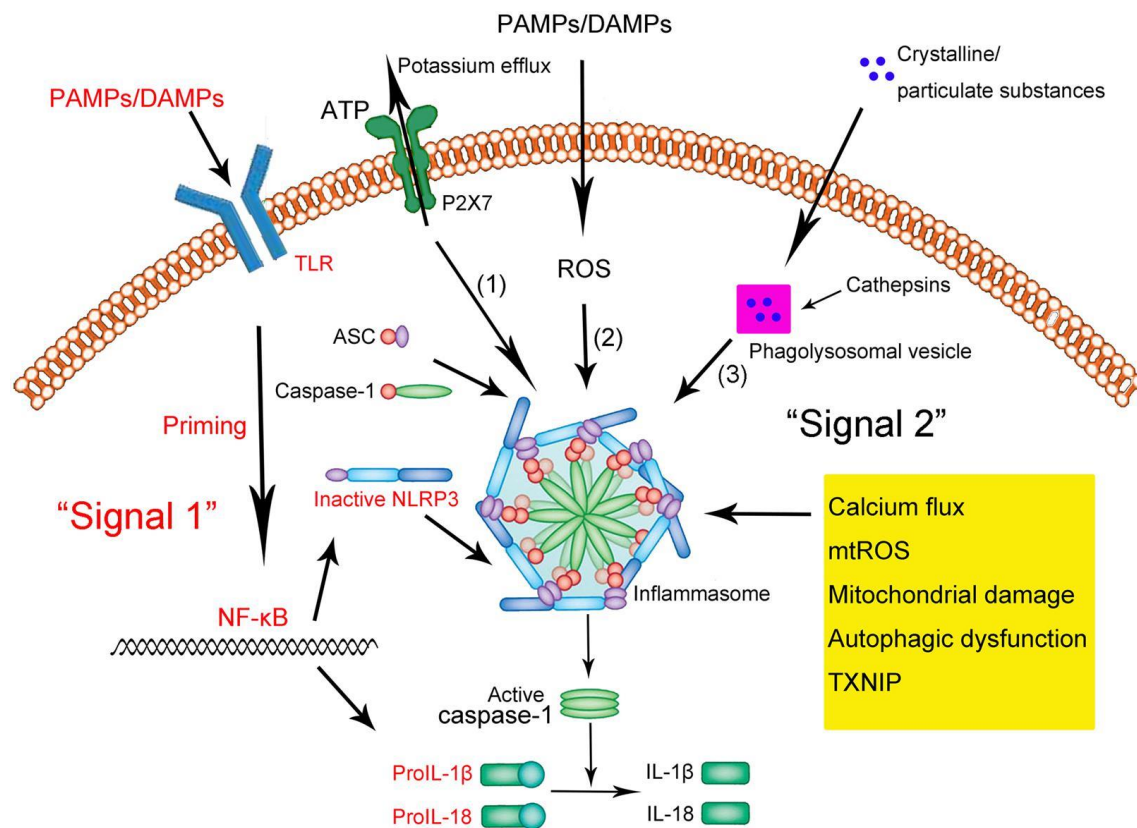


Figura C-Esquema da ativação do inflamassoma NLRP3. Após interação com PAMPs e DAMPs, os TLRs são fosforilados e ativam o NF-κB que migra para o núcleo onde promove a transcrição de NLRP3, pró IL-1β e pró IL-18. Este evento é denominado sinal 1. Um sinal adicional denominado sinal 2, ativa a oligomerização do inflamassoma, desencadeando a conversão de pró caspase-1 em caspase-1 o que permite a conversão das pró IL-1β e pró IL-18 nas respectivas formas biologicamente ativas. Este sinal 2 tem sido atribuído ao ATP extracelular que induz efluxo de K através de um poro purinérgico dependente de P2X7. O fluxo de Ca também está envolvido neste processo. PAMPs e DAMPs podem desencadear a geração de EROS, o que promove a montagem e a ativação do inflamassoma NLRP3 (SHAO et al., 2015).

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 redutase, vitamina D e selênio) (RAYMAN, 2012;

HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O selênio (Se) é um elemento essencial com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e que participa, por exemplo, na dinâmica mitocondrial, regulação dos canais de cálcio e regulação da concentração de radicais livres (RAHMANTO; DAVIES, 2012; CARDOSO et al., 2015; DUNTAS; BENVENGA, 2015). O Se é adquirido principalmente através da dieta na forma inorgânica, como selenito e selenato, ou orgânicas, como selenometionina e selenocisteína (RAHMANTO; DAVIES, 2012). O selenato é o composto inorgânico mais encontrado em tecidos animais e vegetais, tanto nas folhas quanto nos caules. O selenito é usualmente administrado sob a forma de suplementos alimentares. A selenometionina é o composto selenogênico mais abundante, sendo usualmente encontrado em castanhas e grãos de cereais. A selenocisteína é encontrada em plantas como alho, cebola, brócolis e alho-poró selvagem (RAHMANTO; DAVIES, 2012). As diferentes formas de Se costumam ser absorvidos pelo trato intestinal; as selenocisteínas, selenometioninas e seus derivados, que são as formas orgânicas mais ingeridas, são absorvidas no intestino delgado (BÜGEL et al., 2008; DUNTAS; BENVENGA, 2015). O Se é excretado principalmente através da urina e em menor proporção, pelas fezes (BÜGEL et al., 2008). As propriedades biológicas dos aminoácidos metionina, cistina e cisteína contendo Se orgânico vêm sendo estudadas pois foi comprovado que possuem efeitos antioxidantes diretos e indiretos (RAHMANTO; DAVIES, 2012). Seus efeitos dependem da forma de sua incorporação em selenoproteínas as quais estão envolvidas em processos de ativação, proliferação e diferenciação de células do sistema imune inato e adaptativo (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012; CARDOSO et al., 2015). O SNC, um dos órgãos-alvo deste tratamento que estamos propondo, é um órgão privilegiado no que diz respeito ao metabolismo do Se. Estudos indicam que a interação da selenoproteína P e o receptor apoER2 presente na BHE é responsável pela transferência do Se da circulação e de outros tecidos para o cérebro, principalmente em casos em que os níveis se encontrem baixos (CHEN; BERRY, 2003; BURK et al., 2014). Em condições de deficiência grave de Se, sua concentração nos tecidos diminuiu para cerca de 13% de seu nível normal, enquanto sua concentração no cérebro permaneceu em aproximadamente 56% do seu valor normal, indicando uma estratégia de manutenção dos níveis de Se no SNC às custas dos outros tecidos. Baixos níveis de Se no SNC têm sido associados com lesões e aumento dos níveis de oxidação neste tecido (BELLINGER et al., 2009; BURK et al., 2014; CARDOSO et al., 2015). A suplementação com Se tem sido relacionada com atividade antiviral e redução da incidência de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, doença de Parkinson e também com as doenças autoimunes (CHEN; BERRY, 2003; BELLINGER et al., 2009; RAYMAN,

2012; CARDOSO et al., 2015). Alguns relatos da literatura também mostram uma correlação entre os baixos níveis séricos de Se e o aumento do risco de desenvolver doenças autoimunes (SOCHA et al., 2014). Alguns estudos sugerem que a suplementação com Se pode conferir um fenótipo regulador em células T CD4⁺ virgens (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012) e induzir uma diminuição na expressão de fatores de adesão como a E-selectina, determinando redução do processo inflamatório (ZHANG et al., 2002). A adição de Se em culturas de macrófagos polarizou os macrófagos com perfil M1 para um perfil M2, reduzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios (NELSON; LEI; PRABHU, 2011). Aminoácidos selenizados, como selenocisteína e selenometionina possuem efeito antioxidante direto e são fontes de Se para a síntese de proteínas antioxidantes como a glutathione peroxidase, tirotóxina redutase e metionina sulfóxido redutase (RAHMANTO; DAVIES, 2012). Outras funções das selenoproteínas incluem remoção do peróxido de hidrogênio, reparo das proteínas danificadas por oxidação, manutenção do citoesqueleto, formação das pontes dissulfeto nas proteínas e controle da ativação hormonal (LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014). Vários relatos comprovam que compostos sintéticos de Se orgânico mimetizam as funções das selenoproteínas, apresentando propriedades terapêuticas antioxidantes (BARBOSA et al., 2017). Em modelos experimentais de artrite, a terapia oral com Selemax®, uma levedura fonte de Se orgânico, reduziu os parâmetros clínicos da doença em ratos e camundongos. Este efeito foi associado a uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no tecido periarticular (VIEIRA et al., 2012).

Neste contexto, testamos o efeito de uma preparação de cisteína selenizada (CS) na EAE. A CS, como o nome indica, é uma cisteína contendo Se, portanto uma fonte de Se orgânico. Este produto encontra-se em fase de desenvolvimento pela Biorigin, que é um setor de Pesquisa & Desenvolvimento da empresa Zilor (Lençóis Paulista/SP), uma das maiores produtoras brasileiras de etanol, açúcar e energia elétrica a partir da cana-de-açúcar.

Racional

A EM é uma doença inflamatória crônica do SNC e os medicamentos existentes não são eficientes em todos os pacientes e possuem muitos efeitos colaterais. A imunopatogênese da EM é complexa, envolvendo linfócitos Th1, Th17 e Tc, além da ativação de macrófagos e microglia, os quais liberam vários mediadores pró-inflamatórios e radicais livres. O estresse oxidativo tem sido descrito como um importante componente para a evolução clínica da EM. As EROs ativam

um complexo chamado inflamassoma, que libera citocinas pró-inflamatórias, gerando ainda mais desmielinização e dano axonal. Nesse sentido, investigamos se um composto com propriedades antioxidantes poderia modular a neuroinflamação em um modelo experimental de EM. O composto escolhido foi uma CS, que tem menor toxicidade e é melhor absorvida pelo corpo humano do que moléculas de selênio orgânico. O Se é um potente agente antioxidante e anti-inflamatório, utilizado no tratamento de várias doenças, porém ainda não muito estudado em doenças neurodegenerativas. Além disso, ele é alocado conforme necessidade fisiológica, especialmente ao cérebro. Portanto, a nossa hipótese é de que a administração oral de CS em camundongos com EAE seja eficaz no controle da doença, reduzindo o processo inflamatório no SNC.

Objetivos

Objetivos

Objetivo geral

Investigar o potencial terapêutico da cisteína selenizada (CS) para controlar o desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE).

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da CS no desenvolvimento clínico da EAE.
2. Investigar o efeito imunomodulador da CS na resposta imune periférica anti-MOG.
3. Determinar se o Se orgânico administrado atinge o SNC e se modula localmente o nível de estresse oxidativo e a ativação do inflamassoma.
4. Investigar a eficácia terapêutica da CS na EAE remittente-recorrente.

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

Animais. Foram utilizados camundongos C57BL/6 (8-9 semanas de idade) fêmeas, provenientes da Universidade de São Paulo- USP (Ribeirão Preto, SP, Brasil) e camundongos SJL/J (8-9 semanas de idade) fêmeas criadas no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNESP-Botucatu. A criação da cepa SJL/J foi realizada de acordo com as especificações da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA nº1016. Os animais foram mantidos em rack ventilada (Alesco®, Monte Mor, SP, Brasil), em gaiolas com maravalha autoclavada; receberam ração comercial e água filtrada ad libitum também previamente autoclavadas. Os animais foram eutanasiados com anestésico (xilazina e ketamina) e perfundidos com solução salina estéril antes da coleta do material biológico. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as especificações da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA nº1114.

Indução e avaliação clínica da EAE. Para o modelo de doença crônica, camundongos C57BL/6 foram imunizados com 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ (myelin oligodendrocyte glycoprotein–Proteimax) emulsificados em 25 µL de Adjuvante Completo de Freund (Sigma-Aldrich Corp., Missouri, EUA) contendo *Mycobacterium tuberculosis* (2 mg/mL) via subcutânea no dorso. No dia da imunização e 48 horas depois, os animais foram inoculados com 200 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich) via intraperitoneal. Peso corpóreo e sinais clínicos da doença foram avaliados diariamente até a fase aguda da doença (18 dias após indução da EAE). A gravidade da doença foi definida segundo a seguinte escala: 0- normal; 1- cauda frouxa; 2- perda da tonicidade do movimento do quadril; 3- paralisia parcial dos membros posteriores; 4- paraplegia; 5- tetraplegia ou morte.

Para a doença remitente-recorrente, camundongos SJL/J foram imunizados com 100 µg de PLP₁₃₉₋₁₅₁ (proteolipid protein – Proteimax) emulsificados em 25 µL de Adjuvante Completo de Freund (Sigma-Aldrich Corp., Missouri, EUA) contendo *Mycobacterium tuberculosis* (2 mg/mL) via subcutânea no dorso. No dia da imunização e 48 horas depois, os animais foram inoculados com 200 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich Corp., Missouri, EUA) via intraperitoneal. Peso corpóreo e sinais clínicos da doença foram avaliados diariamente até a eutanásia (42 dias após indução da EAE). A gravidade da doença foi definida segundo a

seguinte escala: 0- normal; 0,5 -ponta da cauda frouxa; 1- cauda frouxa; 1,5- cauda frouxa, andar levemente cambaleante; 2- perda da tonicidade do movimento do quadril; 2,5- perda de equilíbrio com ou sem inclinação do camundongo para um dos lados e/ou paralisia de uma das patas inferiores; 3- paralisia quase completa das patas traseiras; 3,5- paralisia completa das patas traseiras; 4- paralisia completa das patas traseiras e paralisia parcial das patas dianteiras; 4,5- paralisia completa das patas traseiras e paralisia parcial das patas dianteiras, camundongo não está alerta; 5- tetraplegia ou morte.

Tratamentos. Os animais receberam, através de gavagem, doses diárias de 125,87 µg de CS contendo 45 µg de selênio por dose, segundo o trabalho de Vieira et al., 2012. No modelo C57BL/6, o tratamento profilático/terapêutico teve início 14 dias antes da indução da EAE e se prolongou até a fase aguda da doença, totalizando 30 doses. As estratégias terapêuticas precoce e tardia foram iniciadas nos dias 1 e 7 após a indução da EAE, respectivamente; ambas se estendendo até a fase aguda da doença.

No modelo SJL/J, o tratamento foi iniciado no 20º dia, na fase de remissão do 1º episódio de sinais clínicos e se estendeu durante as fases de remissão e recidiva até o 42º dia da doença, totalizando 22 doses.

Obtenção de células de linfonodo mesentérico e SNC. Os linfonodos mesentéricos foram macerados com auxílio de êmbolo de seringa sobre peneiras de nylon (cell strainers) com poros de 70 µm. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 400xg por 5 minutos a 4°C e o botão celular ressuspensionado em meio RPMI (Sigma) suplementado com 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não-essenciais, 10% de soro bovino fetal (SBF), 2% de L-glutamina e 1% de gentamicina. Cérebro e medula cervical/torácica obtidos como descrito anteriormente foram processados para obtenção de células mononucleares. Para isto, os órgãos foram incubados com 3 ml de meio RPMI e 1 ml de colagenase D (Roche, Mannheim, Germany) (2,5mg/ml de RPMI) por 45 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Em seguida, as amostras foram maceradas em cell strainers e centrifugadas a 450xg por 15 minutos a 4°C. O botão celular foi ressuspensionado em Percoll 30% e a suspensão obtida foi acomodada sobre 4 ml de Percoll 70% (HBSS) para centrifugação (950xg por 20 minutos a 18°C). Para o preparo dos gradientes de Percoll 30% e 70% em HBSS (Hanks' Balanced Salt solution), utilizamos uma solução estoque de Percoll

isotônico contendo 9 partes de Percoll em 1 parte de HBSS 10x. O halo de células mononucleares foi coletado e transferido para tubos de 15ml contendo HBSS. Após centrifugação (450xg por 10 minutos a 18°C) o botão celular foi ressuspensão em 1 ml de HBSS. Para as avaliações de produção de citocinas e citometria de fluxo, amostras das suspensões celulares foram diluídas em solução de Türk e contadas considerando a morfologia de linfócitos (célula pequena com núcleo arredondado e citoplasma escasso) (PINO; CARDONA, 2011) .

Imunofenotipagem de macrófagos e microglia no SNC. A caracterização da frequência e ativação de macrófagos/microglia ativada ($CD45^{High}CD11b^{+}$) e microglia em repouso ($CD45^{Low}CD11b^{+}$) em material eluído do SNC (cérebro e medula espinhal) foi realizada por citometria de fluxo. As amostras de cada animal (1×10^6 células) foram incubadas com os anticorpos de marcação extracelular anti-CD45 FITC (30-F11), anti-CD11b PerCP-Cy5.5 (M1/70), anti-MHC II APC (M5/114.15.2) por 30 minutos, no escuro a 4°C, segundo instruções do fabricante (eBiosciences). Os resultados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson - BD, Califórnia, EUA) localizado no laboratório de citometria de fluxo, no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-Botucatu/SP. As análises foram realizadas no software FlowJo (TreeStar, Oregon, EUA).

Expressão de genes associados a linfócitos T, macrófagos, migração celular e inflamassoma. Para a extração de RNA, linfonodos inguinais, mesentéricos e medula lombar foram macerados em 300 µL de reagente Trizol (Life Technologies, California, USA). Após completar o volume de Trizol para 1 mL e adicionar 250 µL de clorofórmio, a amostra foi vigorosamente agitada em vórtex por 10 segundos e, em seguida, deixada no gelo por 10 minutos. Após este período, a amostra foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa transferida para um novo tubo e 500 µL de isopropanol gelado foram adicionados. As amostras foram agitadas no vórtex por 10 segundos, incubadas a -20°C por 30 minutos e centrifugadas novamente para remoção cuidadosa dos sobrenadantes. Os pellets foram lavados 2 vezes com etanol 95% por centrifugação a 12.000g por 5 minutos a 4°C e os criotubos foram deixados em temperatura ambiente para secagem dos pellets. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em água livre de nucleases (20-35 µL) e a quantificação de RNA foi realizada

utilizando o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Boston, USA). A pureza do RNA extraído foi baseada na razão das absorbâncias medidas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm; os valores próximos de 2.0 foram considerados aceitáveis. A síntese de cDNA fita simples foi realizada a partir de 1000 ng de RNA, utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, California, USA). A expressão quantitativa de mRNA para os fatores de transcrição das subpopulações de linfócitos T (Tbet, GATA-3, ROR γ t e Foxp3), receptor de quimiocina (CX3CR1), perfil de polarização de macrófagos M1 e M2 (iNOS e Arginase-1) e genes envolvidos com a ativação do inflamassoma NLRP3 (NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1 β) foram analisados por meio de reações de PCR em tempo real (Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System), utilizando o sistema TaqMan, com primers e sondas comercializados pela Life Technologies (Applied Biosystems) .

Tabela 1- Primers utilizados na quantificação de transcritos em amostras de medula lombar (ML) e linfonodo inguinal (LI) por RT-PCR em tempo real.

Primers	Descrição do alvo	Amostra
GAPDH	<i>Housekeeping gene</i> utilizado para análise comparativa	ML/ LI
Mm00840904_m1 (NLRP3)	Fator de transcrição do receptor NALP3, um receptor do tipo NOD que funciona como sensor do complexo do inflamassoma	ML
Mm00451187_m1 (ASC)	Fator de transcrição da proteína carreadora associada a apoptose, proteína adaptadora do complexo inflamassoma	ML
Mm00438023_m1 (Caspase-1)	Fator de transcrição da caspase-1, uma enzima proteolítica que cliva formas precursoras de citocinas pró-inflamatórias, levando a síntese de formas ativas de IL-1beta e IL-18	ML
Mm00434228_m1 (IL-1 β)	Fator de transcrição que regula a produção de IL-1beta, citocina mediadora da resposta imune inflamatória	ML
Mm00440502_m1 (iNOS)	Fator de transcrição associado a produção de óxido nítrico em macrófagos com perfil inflamatório (M1)	ML

Mm00475988_m1 (Arginase-1)	Fator de transcrição da enzima arginase-1, que catalisa a Hidrólise da arginina em macrófagos com perfil anti-inflamatório (M2)	ML
Mm00438354_m1 (CX3CR1)	Fator de transcrição do receptor da quimiocina CX3CL1 (fractalkina) envolvido na adesão e migração de linfócitos	ML
Mm00450960_m1 (Tbx2/ Tbet)	Fator de transcrição que regula a diferenciação de linfócitos Th1	LI
Mm00484683_m1 (GATA-3)	Fator de transcrição que regula a diferenciação de linfócitos Th2	LI
Mm01261022_m1 (ROR- γ)	Fator de transcrição que regula a diferenciação de linfócito Th17	LI
Mm00475162_m1 (Foxp3)	Fator de transcrição que regula a diferenciação de Tregs	LI

Estresse oxidativo na medula lombar. As amostras de medula lombar foram homogeneizadas com tampão de extração RIPA (HEPES 50 mM pH 7,9, KCl 1 M, MgCl₂ 1 M, EDTA 0,1 M, NaF 0,1 M) e coquetel inibidor de protease 1%. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 45 min a 4°C, o sobrenadante coletado e mantido a -80°C para dosagem das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH).

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD). O sobrenadante foi diluído em PBS (0,1 M; pH 7,2) na proporção de 1:20 (p/v). Em 100 μ L do homogenato foram adicionados 150 μ L de solução contendo hipoxantina, xantina oxidase e cloreto de azul de nitrotetrazólio numa proporção de 1: 1: 1. A absorbância foi lida no espectrofotômetro a 560nm a cada minuto durante 10 min, 37 °C. A média da integral foi dividida pela proteína e os resultados foram expressos como U de SOD/ μ g de proteína (WINTERBOURN et al., 1975).

Determinação da atividade da catalase (CAT). O sobrenadante foi diluído em tampão KH₂PO₄ (25 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM e BSA 1%) na proporção de 1:20 (p/ v). Em dois poços

da placa foi adicionado catalase e os mesmos utilizados como controle positivo. Colocou-se 20µl do homogenato numa placa de 96 poços com 100µl de tampão (KH_2PO_4 , 250 mM, pH 7,0), 30µl de metanol e 20µl de H_2O_2 (35,3 mM). A placa foi mantida durante 20 min a temperatura ambiente. Após esse período, 30 µL de hidróxido de potássio (10 mM) e 45 µL de Purpald® foram adicionados e a placa foi mantida sob leve agitação por mais 20 min em temperatura ambiente protegida de luz. Posteriormente, foram adicionados 15 µL de periodato de potássio (65,2 mM) e a placa foi mantida sob leve agitação durante mais 10 min à temperatura ambiente protegida da luz. A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A média da concentração foi dividida pela proteína e os resultados foram expressos como U de CAT / µg de proteína (AEBI, 1984).

Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). O sobrenadante foi diluído em tampão PBS na proporção de 1:10 (p/v). Os níveis de GSH foram determinados usando 100 µL de tampão Tris / EDTA e 100 µL de amostra e realizada uma leitura em espectrofotômetro. Em seguida, foram adicionados 20 µl de ácido 5'5-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), incubado a temperatura ambiente por 15 minutos e realizado uma nova leitura da absorbância. A intensidade da cor amarela foi lida usando espectrofotometria a 412 nm. A média da concentração foi dividida pela proteína e os resultados foram expressos em nmol de GSH / µg de proteína (ANDERSON et al., 1985).

Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA). As amostras de SNC utilizadas para a dosagem do produto de oxidação lipídica foram homogeneizadas com KCl 1,15%. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante coletado e mantido a -80°C. Os sobrenadantes das amostras (400 µL) foram diluídos em água destilada (400 µL), lauril (200 µL), ácido acético (1500 µL) e ácido tiobarbitúrico (1500 µL) em um tubo de vidro. Após incubação a 95 °C por 1 hora em banho-maria, 1mL foi transferido para novos tubos do tipo eppendorf. Após centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 25°C, 200 µl de cada amostra foram pipetados em placas de 96 poços para leitura no espectrofotômetro a 532 nm. A leitura das amostras e da curva padrão foi feita em duplicata e os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

Quantificação de selênio no SNC. As determinações de Se nas amostras de cérebro de camundongos (previamente liofilizadas) foram feitas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite utilizando espectrômetro Shimadzu AA-6800, equipado com um corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema auto-reversível (SR), e um tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Uma lâmpada Shimadzu de cátodo oco de Se operada com uma corrente de 10 mA também foi usada. O comprimento de onda aplicado foi de 196,0 nm e a resolução espectral foi de 0,5 nm. O argônio foi usado como gás inerte a um fluxo constante de 1 L min⁻¹ durante todo o programa de aquecimento, exceto durante a etapa de atomização, quando o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos na área do pico. Foi utilizada no preparo da amostra a metodologia por amostragem em suspensão conforme descrita por SILVA; TÓTH; RANGEL, 2007, com modificações descritas a seguir: cerca de 20 mg de amostras previamente liofilizadas foram transferidas para frascos de 10 mL, em seguida adicionou-se 5 mL de soluções extratora (ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹). As suspensões foram sonicadas com três ciclos de 20 s, utilizando 136 Watts de potência. Após esse procedimento, as suspensões (1mL de cada) foram transferidas para os vials do amostrador automático do espectrômetro de absorção atômica. Em cada vial contendo 1 mL de suspensão de amostra foram adicionados 5 µL de ácido nítrico suprapuro 14 mol L⁻¹, 50 µL de Triton X- 100 a 1% v/v e 100 µL de solução de zircônio 1000 mg L⁻¹. As suspensões das amostras foram então sonicadas novamente com dois ciclos de 20 s, com 136 Watts de potência. A curva analítica utilizada foi preparada por diluição de solução padrão aquosa Titrisol®- Merck, contendo 1000 mg L⁻¹ de Se, na faixa de concentração de 1,00 a 5,00 µg L⁻¹. A acidez do meio foi ajustada a pH=1,00 com ácido nítrico suprapuro. Os valores de absorbância foram medidos injetando-se por meio do amostrador automático do espectrômetro 20 µL de solução padrão e/ou suspensão de amostra para dentro do tubo de grafite de plataforma recoberto internamente com carbeto de tungstênio (SILVA; TÓTH; RANGEL, 2006), utilizando-se no caso, solução tungstato de sódio 1000 mg L⁻¹ como modificador permanente. O programa de aquecimento otimizado para as determinações de selênio está descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para a determinação de Se nas suspensões de amostras de cérebro de camundongo.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	5	0	1
Secagem	120	5	5	1
Pirólise	450	5	10	1
Pirólise	1300	5	10	1
Atomização	2300	2	5	0
Limpeza	2400	5	0	1

Imunofenotipagem de Tregs Foxp3⁺ e células dendríticas em linfonodo mesentérico. A caracterização da frequência de Tregs (CD3⁺CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺) e DCs ativadas (CD11c⁺MHCII⁺) ou DCs com perfil tolerogênico (CD11b⁻CD103⁺) em amostras de linfonodo mesentérico foram realizadas por citometria de fluxo. As células (1x10⁵) foram incubadas com os anticorpos de marcação extracelular CD11b PerCP-Cy5.5 (M1/70), CD11c APC-Cy7 (N418), MHC II APC (M5/114.15.2), CD103 PE (2E7), CD3 PercP 5.5 (145-2C11), CD4 PE-Cy7 (GK1.5) e CD25 APC (PC61.5) por 30 minutos, no escuro e a 4°C. A marcação intracelular foi realizada com kit anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set PE (FJK-16s), segundo instruções do fabricante (eBioscience). A estratégia de gates das DCs foi baseada no trabalho de (RUANE; LAVELLE, 2011). Os resultados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson - BD, Califórnia, EUA) localizado no laboratório de citometria de fluxo, no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-Botucatu/SP. As análises foram realizadas no software FlowJo (TreeStar, Oregon, EUA).

Análise bioquímica sérica de enzimas hepáticas e renais. Após anestesia dos animais, realizamos a coleta do sangue através de punção cardíaca. O soro foi armazenado a -20°C até o momento das análises bioquímicas. A concentração sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transpeptidase (GGT) e fosfatase alcalina

(FA) foi determinada através de kits comerciais (Labtest Diagnóstica AS, Vista Alegre, MG, Brasil) conforme instruções do fabricante. As dosagens de ureia e creatinina foram feitas com kits comerciais provenientes da Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil). As leituras foram realizadas no Analisador Bioquímico Cobas Mira Plus (Roche Diagnostic Systems).

Análise estatística. A análise estatística foi realizada no programa Sigma Plot version 2.0 (1995, Jandel Corporation, Califórnia, EUA). No caso das variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média e desvio padrão e a comparação entre dois grupos foi realizada por teste t não pareado e entre mais de 3 grupos, realizada por ANOVA seguida de teste de Tukey. Quando as variáveis não eram paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalos interquartílicos e a comparação entre os grupos foi realizada por teste de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os gráficos foram montados no programa GraphPad Prism 6 (2012, GraphPad Software, Califórnia, EUA), utilizando os parâmetros analisados no Sigma.

Resultados

Resultados

Tabela 3. Eficácia das diferentes estratégias profiláticas e/ou terapêuticas empregando a CS por via oral em modelo experimental de EM em camundongos das linhagens C57BL/6 e SJL/J.

Camundongo	Tratamento	Animais (n)	Doentes (n)	Incidência		Mediana de escore máximo
C57BL/6	Controle	18	18	100%	p=0,008	2 (1,75- 4)
	Profilaxia/terapia	9	5	55,60%		2 (0-3)
	Terapia Precoce	13	6	46,15%		0 (0-1) *
	Terapia Tardia	12	5	41,67%		0 (0-1) *
						Escore última recidiva
SJL/J	Controle	8	8	100%		2,4 ± 0,4
	Terapia após 1º pico	11	11	100%		0,9 ± 0,2 *

*p<0,05

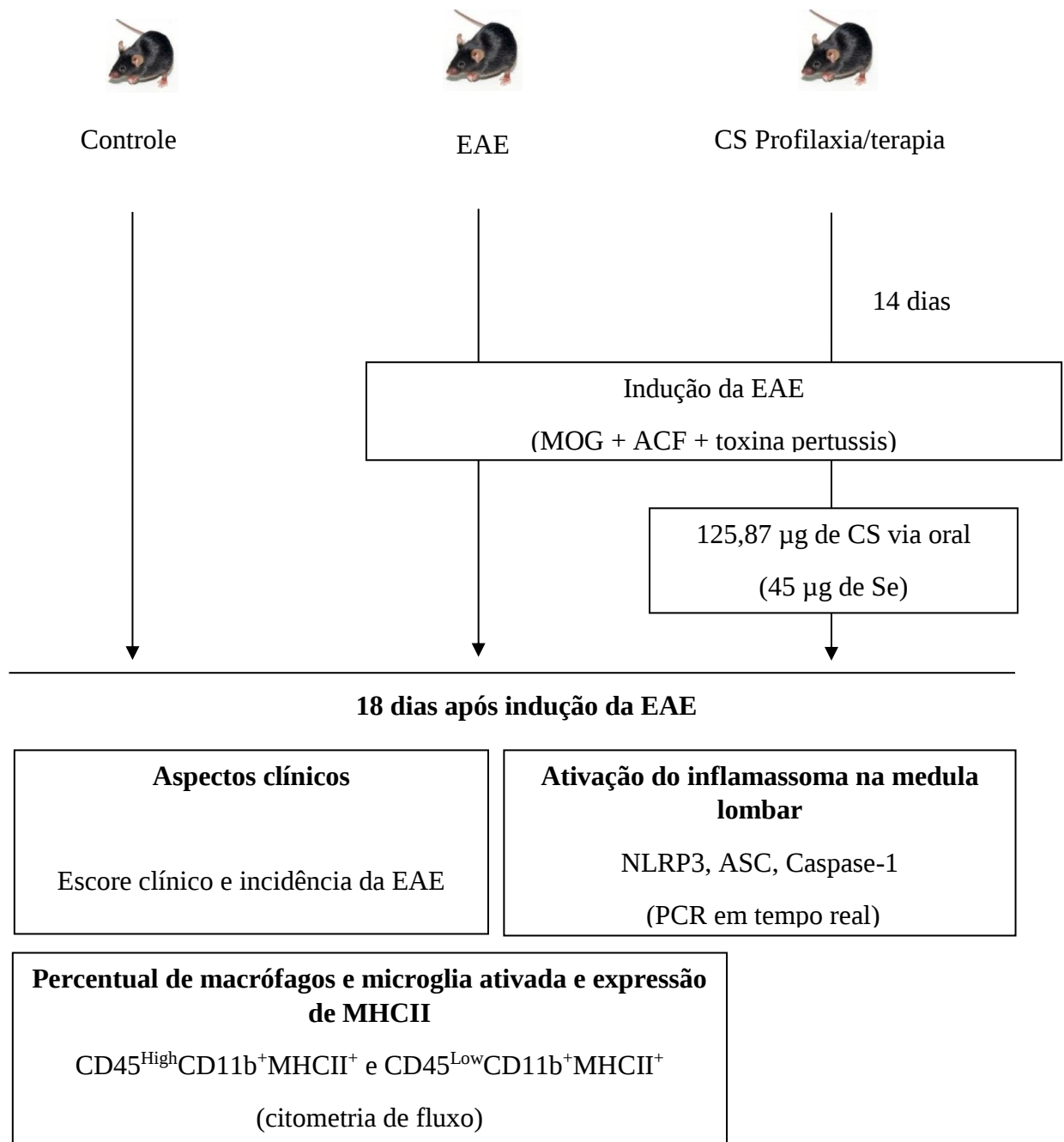
No modelo animal C57BL/6, avaliamos a eficácia terapêutica da CS por via oral empregando três diferentes estratégias: profilaxia/terapia, terapia precoce e terapia tardia. Conforme demonstrado na tabela 2, os diferentes tratamentos com CS foram capazes de controlar o desenvolvimento clínico da EAE, reduzindo a incidência da doença e a intensidade da sintomatologia clínica. Os animais EAE sem tratamento apresentaram 100% de incidência com uma mediana de escore clínico máximo alcançado durante o experimento de 2,0. Como as estratégias terapêuticas iniciadas 1 ou 7 dias após a indução da doença foram mais eficientes no controle da EAE, os mecanismos de proteção foram investigados mais detalhadamente nestes protocolos terapêuticos. Testamos também a eficiência do tratamento com CS no modelo de doença remitente-recorrente. Os animais SJL/J foram tratados diariamente após o 1º pico da doença e a terapia se estendeu até o 42º dia após indução da EAE. Neste momento, os animais não tratados apresentavam uma média de 2,4 enquanto que o grupo que recebeu CS apresentou escore clínico mais brando (0,9) nessa última recidiva.

Delineamento experimental 1

Objetivo: Testar a eficácia da estratégia profilático/terapêutica com CS no desenvolvimento clínico da EAE.

Delineamento experimental 1

Objetivo: Testar a eficácia da estratégia profilático/terapêutica com CS no desenvolvimento clínico da EAE.



Para investigar se a administração de CS possui potencial para controlar a EAE, primeiramente testamos a estratégia profilático/terapêutica, ou seja, iniciamos a administração deste produto por via oral 14 dias antes da indução da doença e continuamos o tratamento até a fase aguda da doença, totalizando 30 doses. Constatamos eficácia terapêutica significativa demonstrada tanto pelo menor escore clínico acompanhado diariamente (Figuras 1A e 1B) quanto pelo escore clínico máximo alcançado pelos animais durante todo o experimento (Figura 1C).

No SNC este efeito protetor foi acompanhado de menor expressão de mRNA para NLRP3 (Figura 1D), expressão similar de ASC (Figura 1E) e queda significativa na expressão de mRNA para caspase-1 (Figura 1F), sugerindo queda na ativação do inflamassoma NLRP3. A proporção e o grau de ativação das células fagocíticas (macrófagos e microglia) também foram afetados pelo tratamento. Observamos menor migração de macrófagos para o SNC (CD45^{High}CD11b⁺) (Figura 1G) e redução significativa da ativação de macrófagos/microglia (Figura 1H) e das células da microglia em repouso (Figura 1I), indicado pela expressão mais baixa de MHCII.

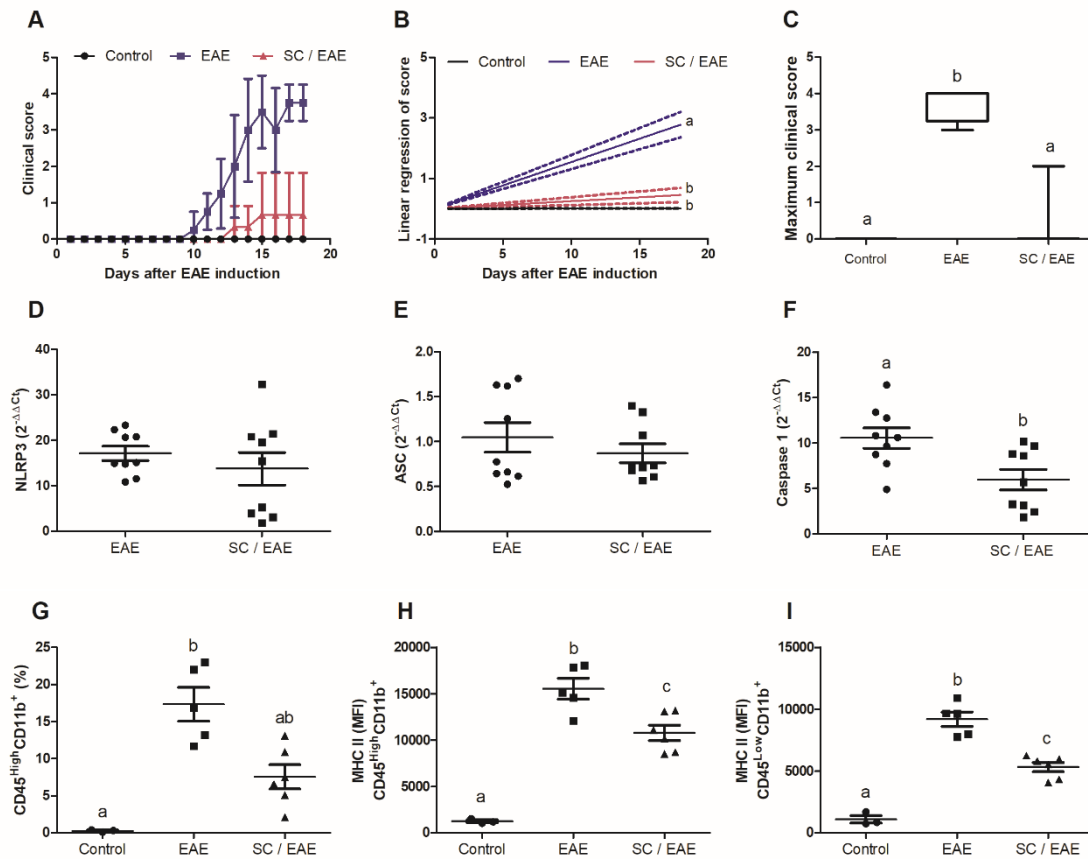
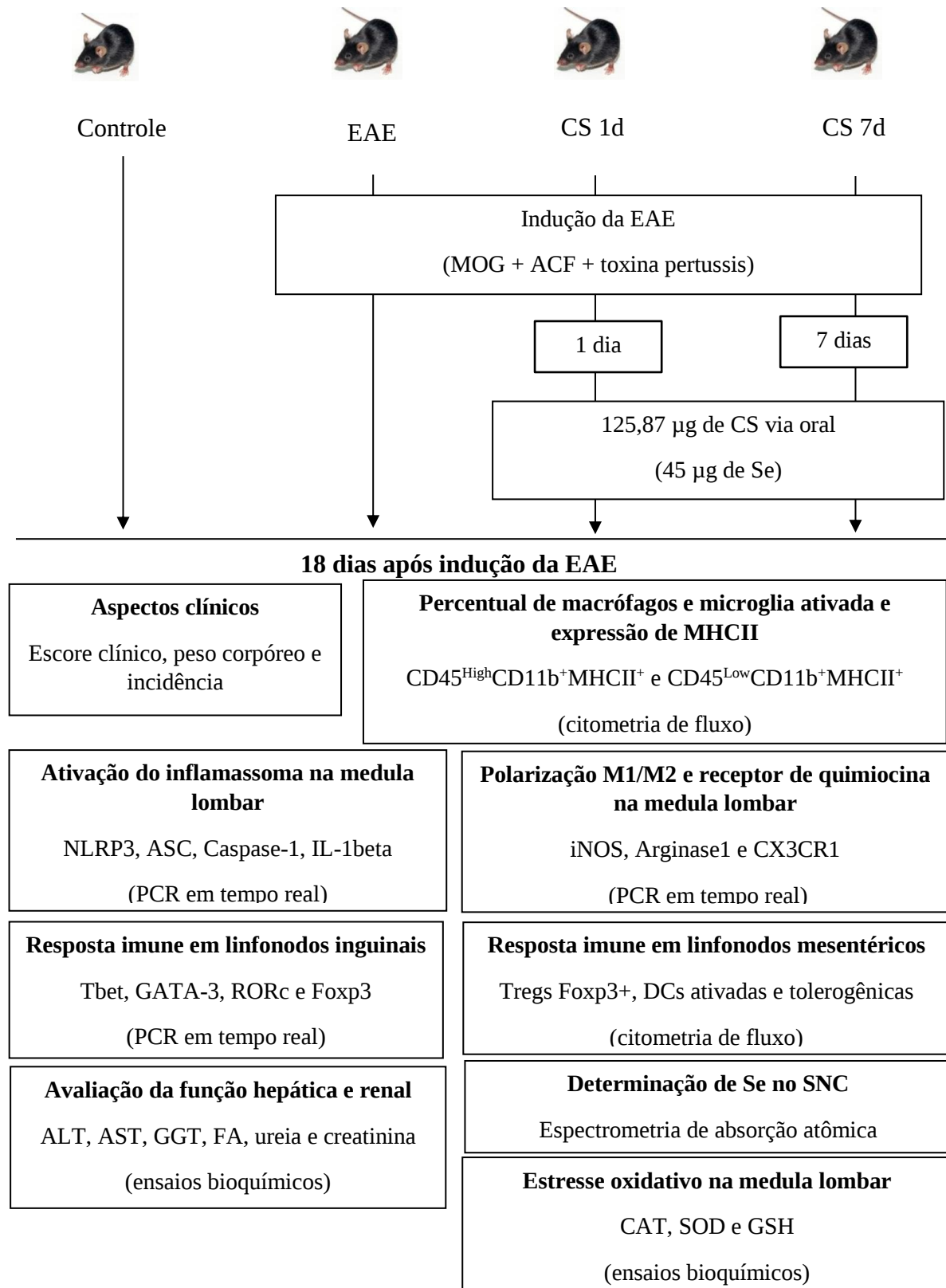


Figura 1: Efeito da estratégia profilático/terapêutica com CS, iniciada 14 dias antes da indução da EAE, na evolução clínica da doença. Escore clínico diário (A), regressão linear do escore clínico (B), média do escore clínico máximo (C). A expressão dos transcritos (mRNA) NLRP3 (D), ASC (E) e caspase-1 (F) no SNC foi analisada por RT-PCR em tempo real durante a fase aguda da EAE. Os níveis de expressão de mRNA foram representados pelos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como calibradores da reação foram utilizados os valores obtidos na análise de SNC de camundongos saudáveis. A proporção de macrófagos/microglia ativada (CD45^{High}CD11b⁺) (G) e a intensidade de expressão da molécula MHCII em macrófagos/microglia ativada (H) e em células da microglia em repouso (I) eluídas do SNC foram analisadas por citometria de fluxo. Resultados representam a mediana em 2 experimentos e intervalos interquartílicos de 3-4 animais por grupo. Letras diferentes significam diferenças significativas entre os grupos $p < 0,05$.

Delineamento experimental 2

Objetivo: Testar o potencial das estratégias terapêuticas precoce e tardia para controlar o desenvolvimento clínico da EAE.



Avaliamos tanto o efeito terapêutico precoce quanto o tardio, ou seja, iniciamos a administração de CS 24 horas ou 7 dias após a indução da EAE, respectivamente. Constatamos eficácia terapêutica significativa indicada tanto por retardo no aparecimento da doença quanto pela intensidade dos parâmetros clínicos. Nos grupos EAE tratados com CS os primeiros sintomas só apareceram no dia 15 enquanto que no grupo controle EAE a doença já apareceu no dia 11. Além disso, a administração precoce ou tardia de CS reduziu significativamente o escore clínico da EAE (Figuras 2A e 2B) e ocorreu ganho de peso corporal (Figura 7C). A mediana do escore clínico máximo no grupo controle EAE foi de 2,0, enquanto que os grupos tratados com CS a partir de 24 horas e 7 dias após a indução da EAE apresentaram mediana de 0,0 (Figura 2C).

Análises realizadas no SNC corroboraram a eficácia terapêutica da CS no desenvolvimento clínico da EAE. A administração precoce ou tardia de CS acarretou menor proporção e redução no grau de ativação das células fagocíticas (macrófagos e microglia) no SNC. Observamos menor migração de macrófagos para o SNC ($CD45^{\text{High}}CD11b^{+}$) (Figura 2E) e menor proporção de microglia ativada ($CD45^{\text{High}}CD11b^{+}$) (Figura 2E) e em repouso ($CD45^{\text{Low}}CD11b^{+}$) (Figura 2H). O tratamento com CS reduziu significativamente a ativação de macrófagos/microglia (Figura 2E) e das células da microglia em repouso (Figura 2H), indicado pela expressão mais baixa de MHCII. A Figura 2D elucida a estratégia de gate das células fagocíticas no SNC. O histograma da Figura 2G ilustra a intensidade de fluorescência (MFI) para MHCII nas células da microglia em repouso dos três grupos experimentais (EAE, terapia precoce e tardia). Observamos também uma queda significativa na ativação do inflamassoma NLRP3, caracterizada por menor expressão de mRNA para NLRP3, ASC e caspase-1 como mostrado na Figura 3. Os resultados da expressão de IL-1 β não são conclusivos.

O perfil de polarização M1/M2 das células fagocíticas também foi analisado na medula lombar dos camundongos com EAE. A terapia tardia com CS reduziu a expressão de mRNA para iNOS (Figura 3D) e Arginase-1 (Figura 3E), perfil de polarização M1 e M2, respectivamente. A terapia precoce não alterou a expressão de iNOS e Arginase-1. Observamos uma expressão significativamente reduzida de mRNA para CX3CR1, um receptor de quimiocinas altamente expresso em células da microglia, nos dois grupos tratados em relação ao controle (Figura 3F). Diferentemente do esperado, a terapia tardia com CS reduziu os níveis de glutathiona reduzida (Figura 3G), superóxido dismutase (Figura 3H) e catalase (Figura 3I) na medula lombar, quando comparado ao grupo EAE sem tratamento. Também foi avaliado se o tratamento com CS afeta a resposta imune periférica. Nos linfonodos inguinais a CS não interferiu significativamente no

perfil das subpopulações de linfócitos T, ou seja, detectamos um aumento discreto na expressão dos fatores de transcrição Foxp3 (Figura 4A), Tbet (Figura 4B) e GATA-3 (Figura 4C) nos grupos tratados com CS e uma leve diminuição de ROR γ t (Figura 4D) nos animais da terapia tardia em relação aos animais EAE não tratados. Portanto, o tratamento com CS não impediu a ativação da resposta imune nos linfonodos regionais. Como a administração da CS é feita por via oral, investigamos também o possível efeito regulador nos linfonodos mesentéricos. Apesar de não ter sido constatado um aumento de Tregs neste local, a queda no percentual de DCs ativadas (Figura 4F) e o aumento no percentual de DCs tolerogênicas (Figura 4G) nos animais tratados com CS, sugere a presença de um ambiente tolerogênico. A estratégia de gate das DCs nos linfonodos mesentéricos está ilustrada nas Figuras 4H, 4I e 4J. O primeiro Contour Plot representa as DCs ativadas (CD11c⁺MHCII⁺). Nas figuras 4I e 4J elucidamos as DCs tolerogênicas (CD11b⁻CD103⁺). No segundo Contour Plot mostramos o gate das células (CD11c^{High}CD11b⁻) para posterior análise do marcador CD103 (Figura 4J).

Como a CS é um produto em desenvolvimento é importante a investigação de possíveis efeitos colaterais. Nesse sentido avaliamos as funções hepática e renal, além do peso corporal durante a administração de CS por via oral. As terapias precoce ou tardia não alteraram os níveis séricos de ALT (Figura 5A), AST (Figura 5B), GGT (Figura 5C), fosfatase alcalina (Figura 5D), ureia (Figura 5E) e creatinina (Figura 5F) quando comparados ao grupo EAE sem tratamento. No entanto, a indução da EAE determinou queda significativa dos níveis de fosfatase alcalina e creatinina em relação aos animais do grupo controle negativo. Com relação a variação de peso corporal entre a fase aguda da doença e o momento de indução da EAE, os animais doentes não tratados perderam em torno de 12% da massa corpórea (Figura 5G). É importante ressaltar que os animais tratados com CS ganharam em torno de 5 a 10% de peso, ou seja, a sintomatologia clínica mais branda da doença não acarretou perda de peso e o ganho de peso dos grupos que receberam CS diariamente foi semelhante aos animais do controle negativo.

Após a avaliação do efeito imunorregulador da CS na neuroinflamação em camundongos com EAE, investigamos se a nossa fonte de Se orgânico estava atingindo o SNC. Detectamos por espectrometria de absorção atômica um aumento significativo da concentração de Se (Figura 5H) em relação ao controle negativo e ao grupo EAE não tratado.

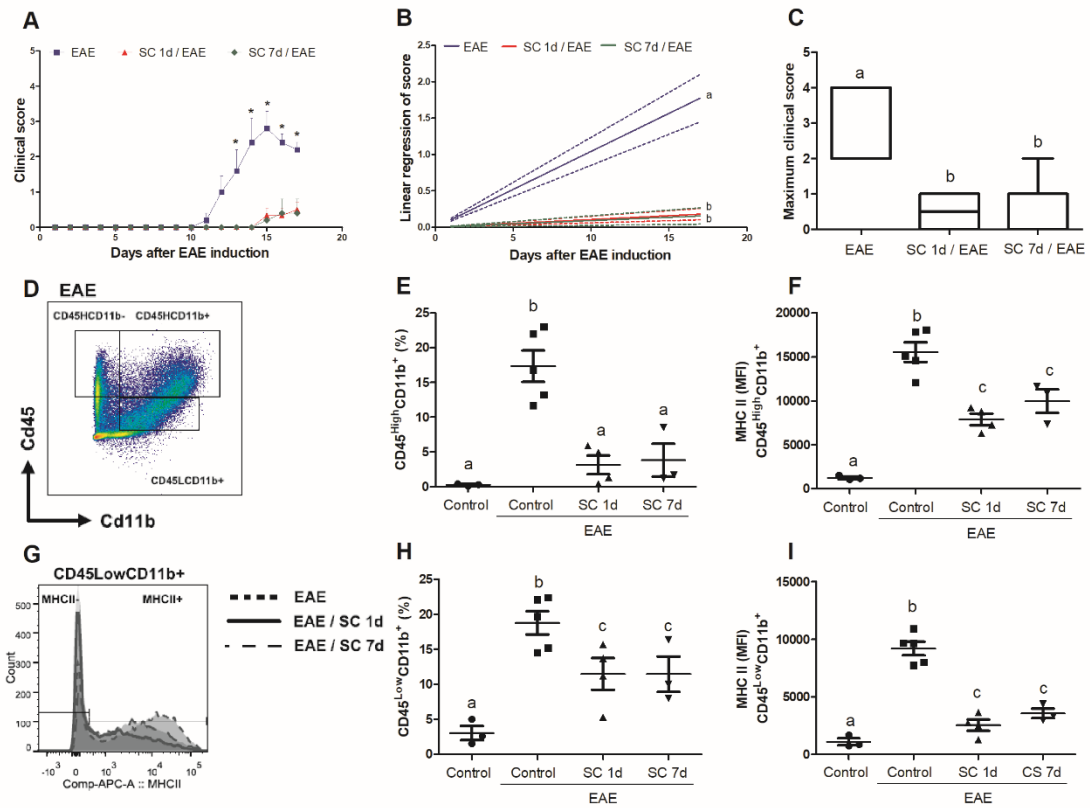


Figura 2: Efeito das terapias precoce e tardia na evolução clínica, infiltração e ativação de macrófagos e microglia. Escore clínico diário (A), regressão linear do escore clínico (B), média do escore clínico máximo (C). A proporção de macrófagos/microglia ativada (CD45^{High}CD11b⁺) (E), proporção de células da microglia em repouso (CD45^{Low}CD11b⁺) (H), intensidade de fluorescência (MFI) da molécula MHCII em macrófagos/microglia ativada (F) e em células da microglia em repouso (I) eluídas do SNC foram analisadas por citometria de fluxo. Estratégia de gate das células fagocíticas de um animal com EAE (D) e histograma de MFI para MHCII nas células da microglia em repouso dos três grupos experimentais: EAE, terapia precoce e tardia (G). Resultados representam a mediana de 1 experimento e intervalos interquartílicos de 5-6 animais por grupo. Letras diferentes significam diferenças significativas entre os grupos $p < 0,05$.

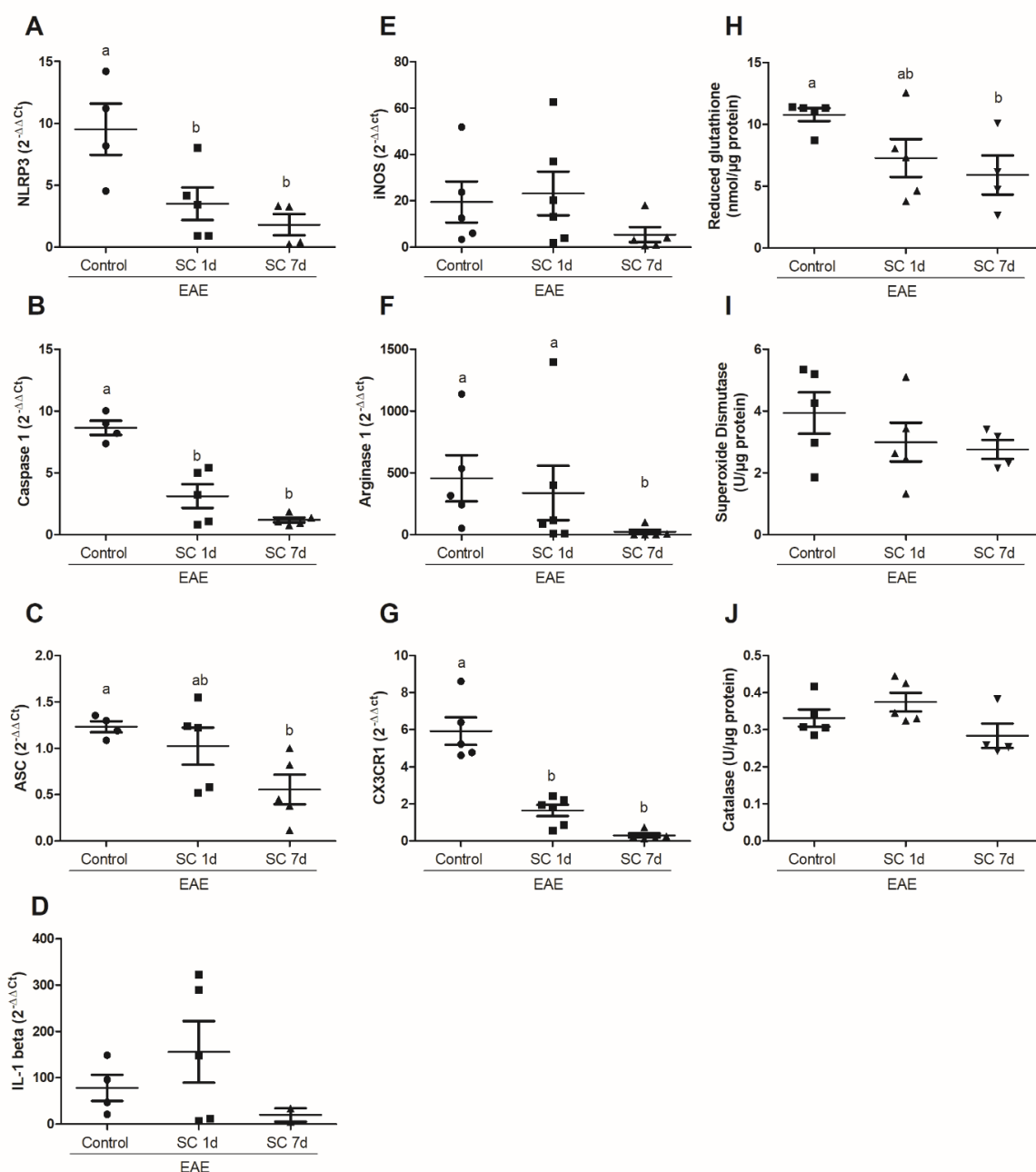


Figura 3: Efeito das terapias precoce e tardia na expressão de genes (mRNA) associados ao inflamassoma NLRP3, perfil M1/M2 dos fagócitos, receptor para quimiocinas e estresse oxidativo no SNC. A expressão dos transcritos (mRNA) NLRP3 (A), caspase-1 (B), ASC (C), IL-1beta (D), iNOS (E), Arginase-1 (F) e CX3CR1 (G) foi analisada por RT-PCR em tempo real. Os níveis de expressão de mRNA foram representados pelos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como calibradores da reação foram utilizados os valores obtidos da análise de SNC de camundongos saudáveis. Níveis de glutathiona reduzida (H), superóxido dismutase (I) e catalase (J) foram determinados por ensaios bioquímicos. Resultados representam a mediana de 2 experimentos e intervalos interquartílicos de 5-6 animais por grupo. Letras diferentes significam diferenças significativas entre os grupos $p < 0,05$.

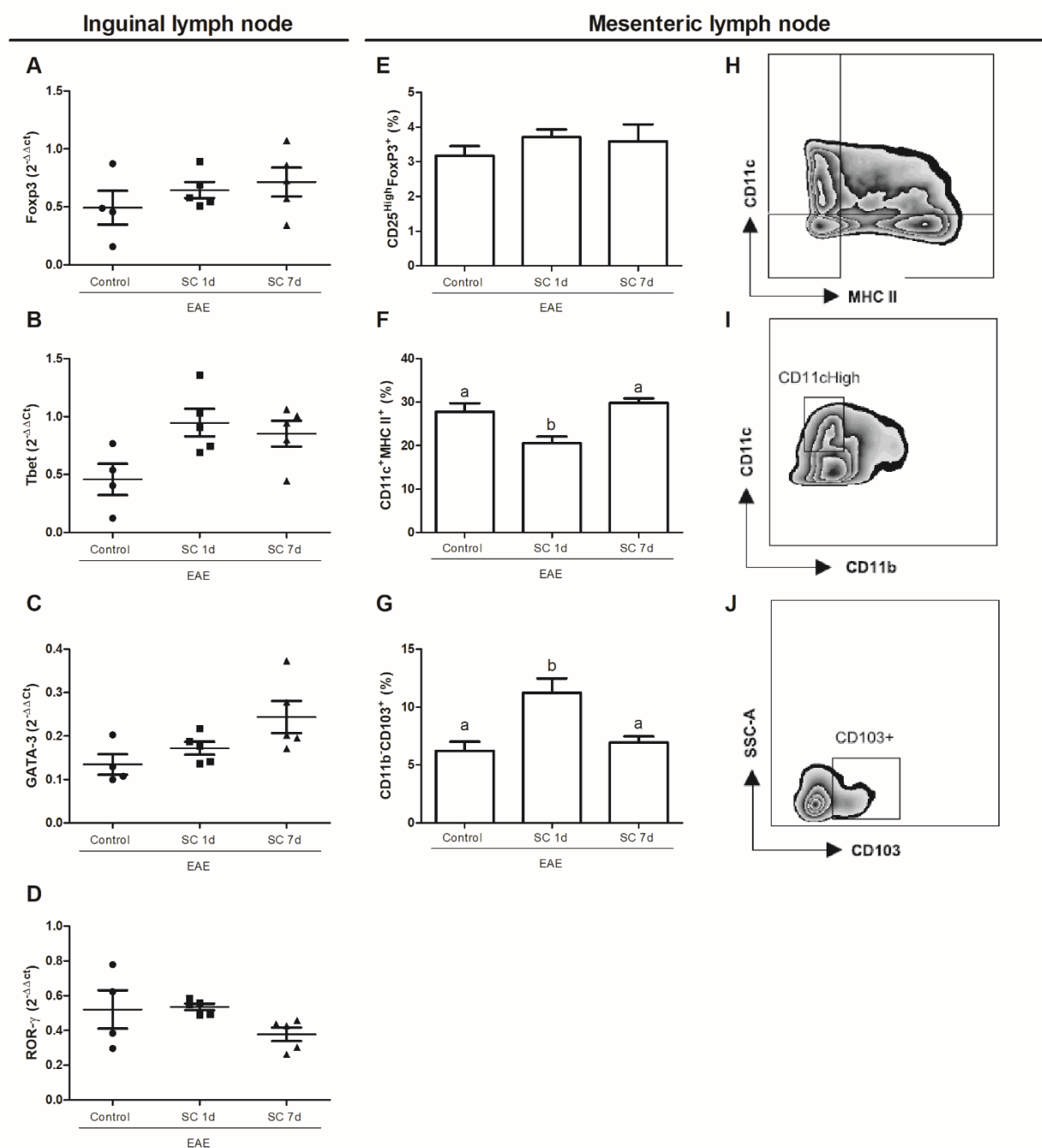


Figura 4: Efeito das terapias precoce e tardia nas subpopulações de linfócitos T no linfonodo inguinal e no perfil tolerogênico nos linfonodos mesentéricos. A expressão dos transcritos (mRNA) Foxp3 (A), Tbet (B), GATA-3 (C) e ROR γ t (D) foi analisada por RT-PCR em tempo real. Os níveis de expressão de mRNA foram representados pelos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como calibradores da reação foram utilizados os valores obtidos da análise de linfonodos inguinais de camundongos saudáveis. A proporção de Tregs Foxp3⁺ (E), DCs ativadas (CD11c⁺MHCII⁺) (F) e a proporção de DCs tolerogências (CD11b⁺CD103⁺) (G) foram analisadas por citometria de fluxo. Contour Plot representando as DCs ativadas (CD11c⁺MHCII⁺) de um animal EAE (H), o gate das células CD11c^{High}CD11b⁻ (I) para posterior análise

do marcador CD103 (J). Resultados representam a média $\pm$ EPM ou a mediana de 1 experimento e intervalos interquartílicos de 5-6 animais por grupo. Os resultados Letras diferentes significam diferenças significativas entre os grupos $p < 0,05$.

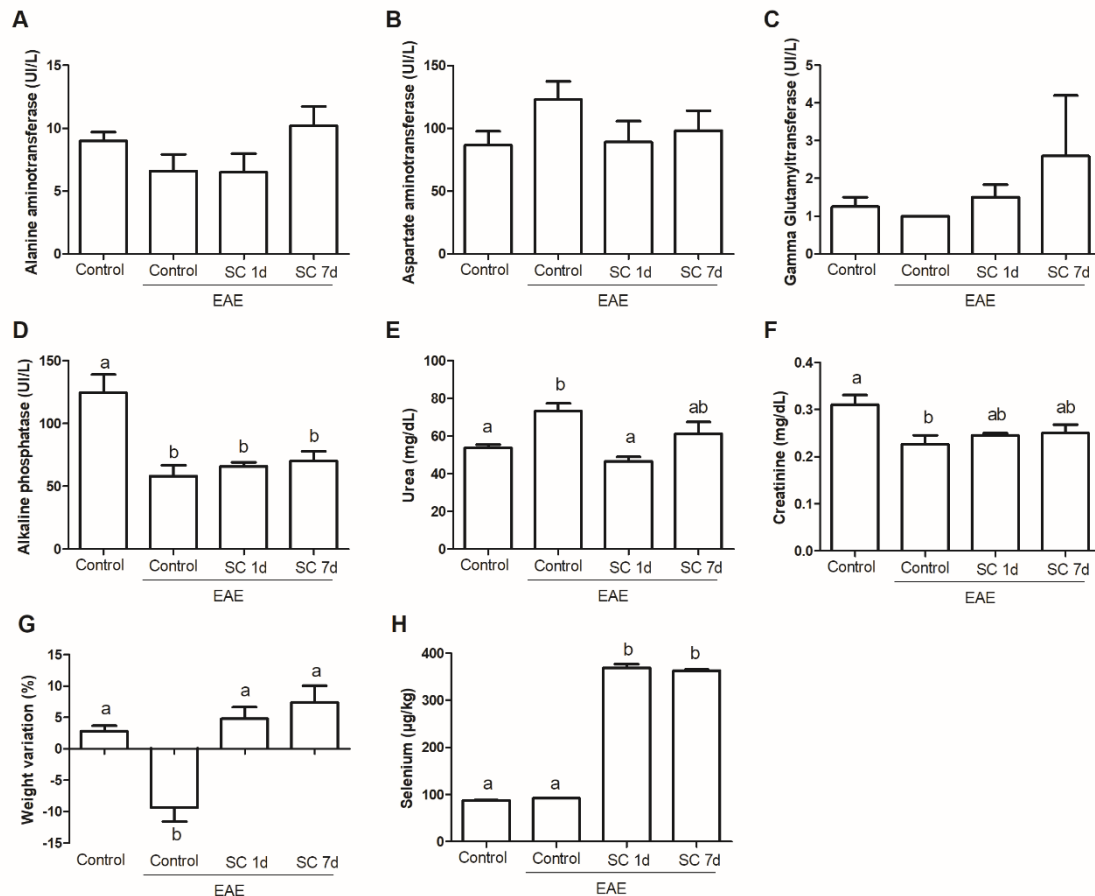
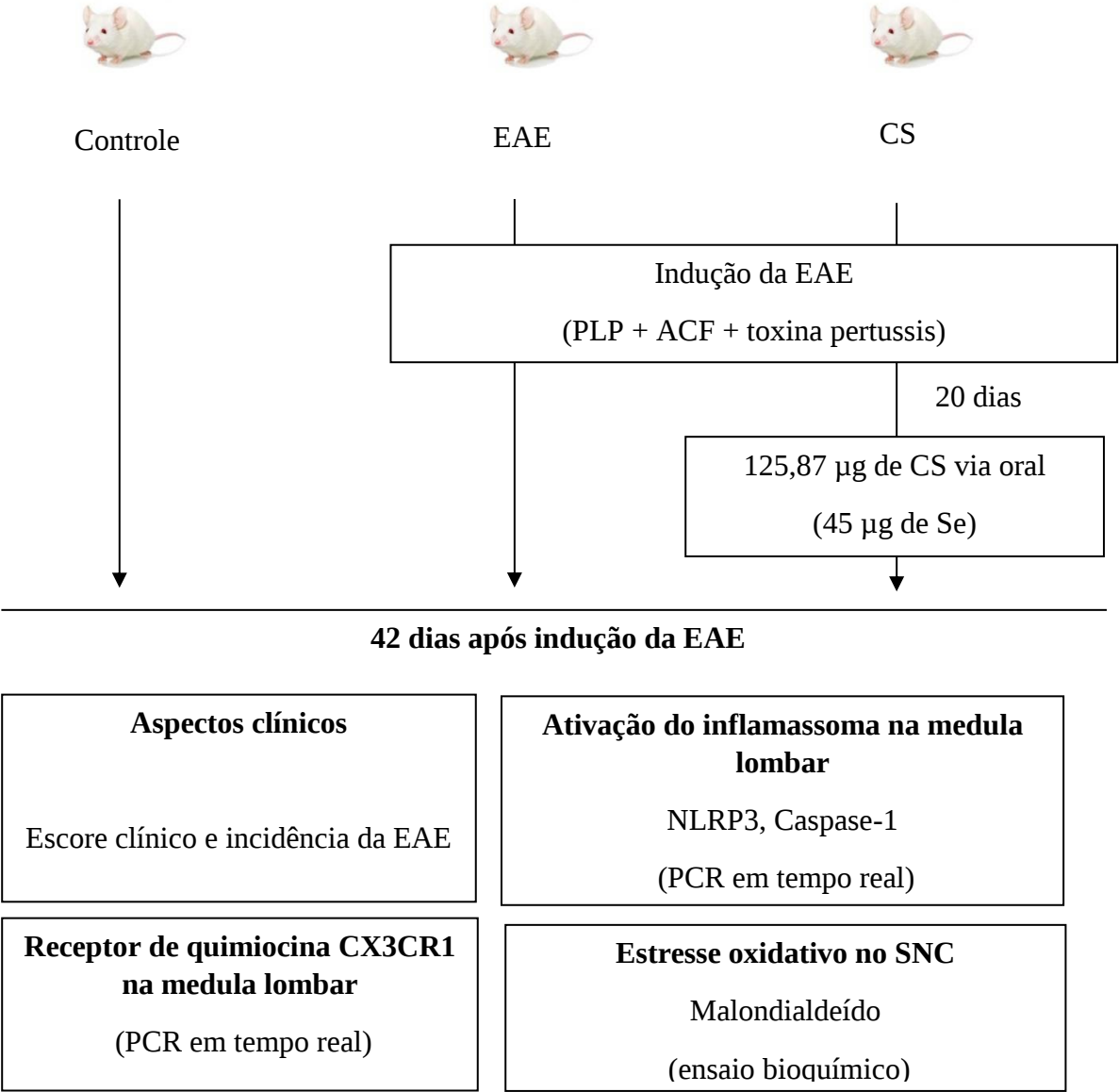


Figura 5: Efeito das terapias precoce e tardia nas funções hepática e renal, no peso corporal e nos níveis de Se no SNC. A quantificação sérica das enzimas hepáticas ALT (A), AST (B), GGT (C) e fosfatase alcalina (D) e as dosagens de ureia (E) e creatinina (F) de 1 experimento foram realizadas por ensaios bioquímicos. A variação de peso corporal foi determinada entre a fase aguda da doença e o momento de indução da EAE (G) de 2 experimentos. A concentração de Se no SNC foi determinada por espectrometria de absorção atômica de 1 experimento. Resultados representam a média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo. Letras diferentes significam diferenças significativas entre os grupos $p < 0,05$.

Delineamento experimental 3

Objetivo: Testar a eficácia da estratégia terapêutica com CS na EAE remitante-recorrente.



Para reforçar a possível translação destes dados encontrados no modelo experimental para a doença humana correspondente, investigamos se a administração desse aminoácido selenizado era eficiente no controle da EAE remitente-recorrente. Para isso induzimos a doença na cepa SJL/J e acompanhamos o aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença. A administração oral de CS teve início 20 dias após indução da EAE, período no qual os animais estavam na primeira fase de remissão do escore clínico. O tratamento diário com CS se estendeu até o 42º dia da doença. Observamos que o grupo tratado com CS apresentou uma sintomatologia clínica mais branda durante as fases de recidiva da doença (Figura 6A). Esse efeito protetor foi acompanhado de queda significativa dos níveis de malondialdeído (Figura 6B), um produto da oxidação lipídica, que sugere um menor índice de estresse oxidativo no grupo tratado. Na medula lombar, observamos uma queda na ativação do inflamassoma NLRP3 após o tratamento com CS, caracterizada por uma menor expressão de mRNA para NLRP3 (Figura 6C) e caspase-1 (Figura 6D), além de uma expressão reduzida de mRNA para CX3CR1 (Figura 6E).

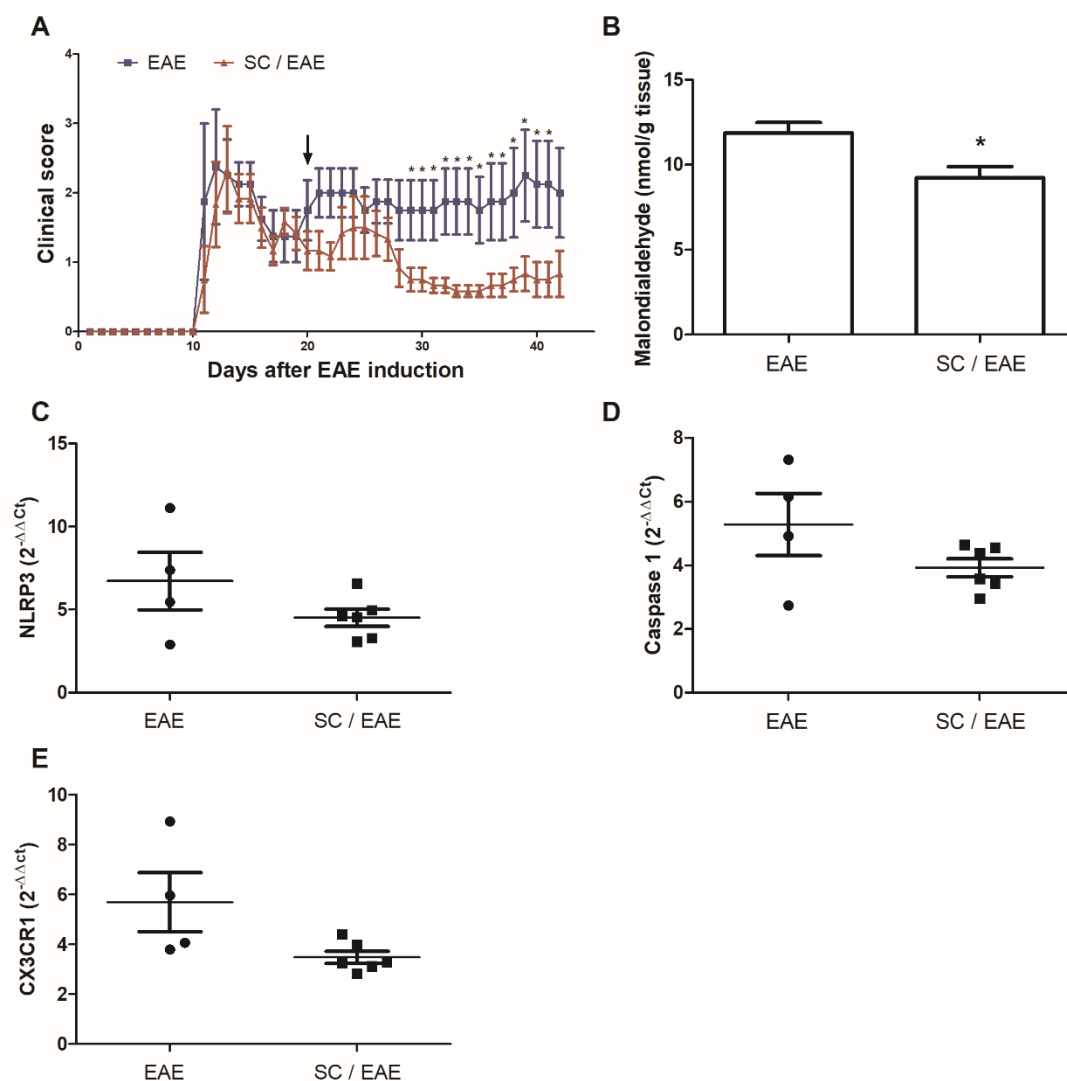


Figura 6: Efeito da estratégia terapêutica com CS na evolução clínica da EAE remitante-recorrente. Escore clínico diário (A) e níveis de malondialdeído no SNC (B). A expressão dos transcritos (mRNA) NLRP3 (C), caspase-1 (D) e CX3CR1 (E) na medula lombar foi analisada por RT-PCR em tempo real 42 dias após a indução da doença. Os níveis de expressão de mRNA foram representados pelos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como calibradores da reação foram utilizados os valores obtidos da análise de SNC de camundongos saudáveis. Resultados representam média $\pm$ EPM ou a mediana de 2 experimentos e intervalos interquartílicos de 4-6 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Discussão

Discussão

A EM é uma doença inflamatória autoimune mediada principalmente por diferentes subpopulações de linfócitos T específicos para antígenos da bainha de mielina que recobre e protege os axônios (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; DENDROU; FUGGER, 2017). Acredita-se que estes linfócitos são ativados na periferia e que, posteriormente, atravessam a BHE, atingindo assim o SNC (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; HARTUNG et al., 2014b; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Os tratamentos disponíveis baseiam-se em imunomodulação, visando bloquear uma ou mais etapas deste processo. Entretanto, a maioria das drogas em uso apresenta algum efeito colateral, em especial o desencadeamento de imunossupressão e o consequente aumento de suscetibilidade aos agentes infecciosos. É consenso na literatura que novos fármacos são necessários para que possam servir como terapias adjuntas e assim diminuir as concentrações das drogas em uso. Os testes com as drogas candidatas são usualmente realizados no modelo animal de EM que é conhecido como EAE (GHASEMI; RAZAVI; NIKZAD, 2017). Este modelo é amplamente utilizado tanto para testar tanto o efeito terapêutico quanto o efeito imunomodulador.

O Se é um microelemento vital que é necessário para uma infinidade de atividades biológicas (SOBOLEV et al., 2018), atuando principalmente através de sua incorporação em selenoproteínas. Seus efeitos sobre o sistema imunológico são complexos e incluem participação na ativação, proliferação e diferenciação de células imunes inatas e específicas e também regulação da resposta imune excessiva e inflamação crônica (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012). A suplementação de Se já é considerada como uma oportunidade terapêutica para controlar as patologias inflamatórias (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012). Sua possível utilização como terapêutica adicional na EAE não vem sendo investigada. Apenas uma publicação mostrou que o difenil disselenito, um composto de Se sintético administrado por via oral, foi capaz de reduzir o desenvolvimento de EAE (CHANADAY; DE BEM; ROTH, 2011).

Neste contexto, testamos o potencial de uma fonte de Se orgânico, uma cisteína selenizada (CS), para controlar a inflamação que ocorre no SNC de modelos murinos de EM. Inicialmente utilizamos o modelo C57BL/6, caracterizado pelo desenvolvimento de uma doença crônica, para testar a eficácia terapêutica da CS, um produto em fase de desenvolvimento pela empresa brasileira Borigin. A estratégia preliminar foi a profilático/terapêutica, ou seja, iniciamos a administração deste produto 14 dias antes da indução da EAE e continuamos por mais 16 dias

após a indução da doença. Posteriormente testamos 2 estratégias terapêuticas, as quais foram iniciadas 1 e 7 dias após a indução da EAE. Para fins de comparação e discussão, nos referimos a estes 3 procedimentos como estratégia profilático/terapêutica, terapia precoce e terapia tardia, respectivamente. Para finalizar essa investigação, utilizamos camundongos da cepa SJL/J, os quais desenvolvem uma doença similar à doença remittente-recorrente humana. Neste caso, o tratamento foi iniciado no período de remissão associado com o primeiro pico que ocorreu no 20º dia. O tratamento foi realizado diariamente até o 42º dia.

No modelo C57BL/6, a estratégia profilático/terapêutica mostrou-se bastante eficaz no controle da doença, tendo determinado queda significativa no escore clínico e na perda de peso em relação ao controle. A incidência da doença também foi menor neste grupo. Para determinar se este efeito protetor estava relacionado com alterações no estado de ativação das populações de macrófagos infiltrantes e microglia ativada (CD45^{High}CD11b⁺) e microglia em repouso (CD45^{Low}CD11b⁺), as células eluídas do SNC foram analisados por citometria de fluxo. O percentual de macrófago/microglia ativada foi menor no grupo tratado, o que está coerente com o efeito protetor, uma vez que esta população celular está claramente envolvida na imunopatogênese da EAE e da EM (ABOURBEH et al., 2012). Em função do efeito protetor observado, esperávamos menor nível de ativação nestas células como descrito por (NELSON; LEI; PRABHU, 2011). No referido trabalho a adição de Se em culturas de macrófagos M1 determinou polarização de perfil M1 para perfil M2, reduzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios. A população constituída pela microglia em repouso também estava em uma menor porcentagem e com menor expressão de MHCII. Este efeito protetor da CS também determinou uma menor ativação do inflamassoma avaliado na porção lombar da medula espinhal. Este achado é coerente com as evidências de que a ativação desta plataforma está envolvida na imunopatogênese da EAE/EM (LANG et al., 2018). Até o momento, ainda não sabemos se esta ativação diminuída do inflamassoma se deve a um efeito na resposta imune periférica, a alterações na quantidade/qualidade de células que atravessaram a BHE ou se está relacionada com inibição local e direta de alguma das etapas da ativação do inflamassoma. Recentemente, pesquisadores demonstraram efeito direto do Se sobre a plataforma do inflamassoma. Altas doses de Se na dieta atenuaram a mastite em camundongos C57BL/6 infectados por *Staphylococcus aureus*, através da redução da ativação do inflamassoma NLRP3 (MA et al., 2018). Entretanto, considerando que o Se tem propriedades antioxidantes e que os radicais livres ativam o inflamassoma, é provável que a CS iniba também este sistema de forma indireta, isto é, neutralizando os radicais livres.

Acreditamos que durante a fase mais tardia da doença, o animal controle EAE exibe uma maior concentração de enzimas antioxidantes, como uma resposta do organismo para controlar o estresse oxidativo no SNC, reduzindo o processo inflamatório e direcionando a sintomatologia para uma fase crônica da doença.

As terapias precoce e tardia também controlaram eficazmente o desenvolvimento clínico da EAE, tendo diminuído tanto a perda de peso quanto o escore clínico. De forma similar ao que observamos na estratégia profilático/terapêutica, nas terapias precoce e tardia também constatamos porcentagem diminuída de macrófagos infiltrantes e microglia ativada. Estas células estavam menos ativadas do que as células correspondentes no grupo EAE ou seja, apresentavam menor expressão de MHCII. O efeito sobre a microglia em repouso foi similar ao observado anteriormente, ou seja, determinou queda na porcentagem e no nível de expressão de MHCII.

Outros parâmetros reforçaram o efeito anti-inflamatório local de CS, incluindo diminuição da ativação de componentes do inflamassoma e redução da expressão de mRNA para iNOS e CX3CR1. A participação fundamental do inflamassoma nas doenças neurodegenerativas é apoiada por muitas evidências (HENEKA; MCMANUS; LATZ, 2018). Recentemente, tem sido descrito na literatura que a inibição farmacológica de constituintes do inflamassoma é capaz de controlar o desenvolvimento de EAE e, portanto, tem sido considerada uma terapia possível para pacientes com EM (KHAN et al., 2008; MCKENZIE et al., 2018). A diminuição dos níveis de iNOS em camundongos tratados é sustentada por vários relatos que encontraram resultados similares após terapia (FENG et al., 2014; LUBINA-DĄBROWSKA et al., 2017).

A expressão reduzida de CX3CR1 parece ser bastante relevante porque este receptor está envolvido em funções antagônicas durante a EAE/EM, provavelmente em momentos distintos da doença. A característica dessas duas patologias é a infiltração acentuada de leucócitos no SNC (MILLER; BAI, 2007; MILLER et al., 2012). O principal papel desse receptor durante a fase inicial parece ser permitir o recrutamento de leucócitos para o SNC (BLAUTH; OWENS; BENNETT, 2015). A relevância desta função é ilustrada pela demonstração de que os inibidores de CX3CR1 atenuaram a gravidade da doença (redução da paralisia, recidivas e também da patologia do SNC) em ratos Dark Agout (RIDDERSTAD WOLLBERG et al., 2014). Ao contrário, quando o receptor de fractalkina (CX3CR1) foi inibido, os camundongos desenvolveram uma doença mais grave, que tem sido atribuída à migração diminuída de células NK para o SNC (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012), cujo mecanismo de proteção tem sido

associado com toxicidade contra os linfócitos T encefalitogênicos. Mais recentemente, foi descrito que a expressão de CX3CR1, principalmente na microglia, era crucial tanto para a remoção de detritos de mielina como para a remielinização subsequente (HERTWIG et al., 2015). A forte imunomodulação observada sugere que a CS está alcançando e atuando, pelo menos parcialmente, *in situ*. Efetivamente, altos níveis de Se, quase 4 vezes maior, foram detectados no SNC de camundongos tratados. Apesar das alterações imunológicas periféricas discretas, não descartamos a possibilidade de que estejam contribuindo como um mecanismo adicional de proteção. Como a doença foi induzida por imunização subcutânea na base da cauda, o acúmulo de células efectoras nos linfonodos inguinais era esperado. Eles foram, portanto, usados para determinar as subpopulações de células T, avaliando seus fatores de transcrição. Ambas as terapias tendem a aumentar a expressão de mRNA que codifica Foxp3 (Tregs), Tbet (Th1) e GATA-3 (Th2). As Tregs estão amplamente relacionadas a mecanismos de proteção na EAE e MS (JONES; HAWIGER, 2017). Como a CS foi administrada por via oral, os linfonodos mesentéricos foram escolhidos para verificar a presença de Tregs e DCs. Apesar de dados da literatura mostrarem que o Se é capaz de regular positivamente as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ aumentando a expressão de mRNA de Foxp3 em camundongos, não observamos aumento de Tregs Foxp3⁺.

Modulação envolvendo DCs foi detectado apenas na terapia precoce. A diminuição evidente nas DCs CD11b⁺MHCII⁺ associada a um aumento também significativo nas DCs CD11b⁻CD103⁺ e a participação distintas destas duas populações de DCs (diferenciação de células T efectoras ou reguladoras, respectivamente) sugerem que a CS esteja modulando estes tipos de respostas.

Enquanto os camundongos da cepa C57BL/6 imunizados com MOG constituem um modelo de doença crônica, os camundongos da cepa SJL/J desenvolvem uma doença caracterizada por surtos e remissões e, por isto, são utilizados como modelo de EM remittente-recorrente. A CS foi testada em ambos os modelos para investigar se seu potencial terapêutico se aplicaria aos diferentes tipos de EM. No modelo C57BL/6, a CS foi utilizada para avaliar a eficiência no controle da evolução da EAE em um período bem precoce, antes da montagem da resposta imune e também em um período mais tardio (sete dias após), quando a resposta imune já estaria montada. Apesar da EAE no C57BL/6 não ser um modelo ideal em relação ao tratamento de pacientes, pois poucos pacientes apresentam este tipo de EM este é um bom modelo para estudar os mecanismos de ação de novos fármacos. Já a doença no SJL/J se aproxima mais da maioria

dos pacientes com EM os quais apresentam surtos seguidos de remissões que são usualmente acompanhados de sequelas. Este modelo ilustra bem o potencial da CS como intervenção terapêutica, ou seja, após o animal ter apresentado a sintomatologia da doença. Apesar de serem dois modelos que se assemelham a diferentes tipos de EM, constatamos eficácia semelhante.

Conclusão

Os resultados observados confirmam a eficácia protetora da CS na neuroinflamação que caracteriza a EM, reforçando nossa hipótese de que este produto tem potencial para ser utilizado como terapia adjunta em pacientes com esta doença.

Referências

Referências

- ABOURBEH, G. et al. Imaging Microglial/Macrophage Activation in Spinal Cords of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Rats by Positron Emission Tomography Using the Mitochondrial 18 kDa Translocator Protein Radioligand [18F]DPA-714. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 17, p. 5728–5736, 2012. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2900-11.2012>>.
- AEBI, H. Oxygen radicals in biological systems: Preface. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 1947, p. 121–126, 1984.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S. Pathogen recognition by innate immunity. **Skin Research**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2006.
- AKTAS, O. et al. Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 7, p. 373–382, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2010.76>>.
- ANDERSON, M. E. et al. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide.pdf. v. 113, n. 1983, p. 548–555, 1985.
- BARBOSA, N. V. et al. Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents. **Metallomics**, v. 9, n. 12, p. 1703–1734, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7MT00083A>>.
- BAUERNFEIND, F. et al. NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 2, p. 787–791, 2009.
- BELLINGER, F. P. et al. Regulation and function of selenoproteins in human disease. **Biochemical Journal**, v. 422, n. 1, p. 11–22, 2009.
- BLAUTH, K.; OWENS, G. P.; BENNETT, J. L. The ins and outs of B cells in multiple sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. NOV, p. 1–7, 2015.
- BROWNE, P. et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: a growing global problema with widespread inequity. **Neurology**, v. 83, n. 11, p. 1022–1024, 2014. Disponível em: <www.neurology.org/content/83/11/1022.long>.
- BUC, M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. **Mediators Inflamm**, 2013.
- BÜGEL, S. et al. Absorption, excretion, and retention of selenium from a high selenium yeast in men with a high intake of selenium. **Food and Nutrition Research**, v. 52, p. 1–8, 2008.
- BURK, R. F. et al. Selenoprotein P and apolipoprotein e receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. **FASEB Journal**, v. 28, n. 8, p. 3579–3588, 2014.
- CARDOSO, B. R. et al. Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases. **Metallomics**, v. 7, n. 8, p. 1213–1228, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5MT00075K>>.
- CHANADAY, N. L.; DE BEM, A. F.; ROTH, G. A. Effect of diphenyl diselenide on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neurochemistry International**,

v. 59, n. 8, p. 1155–1162, 2011.

CHEN, J.; BERRY, M. J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n. 1, p. 1–12, 2003.

COLTON, C.; GILBERT, D. Microglia, an in vivo source of reactive oxygen species in the brain. **Advances in neurology**, 1993.

DAMAL, K.; STOKER, E.; FOLEY, J. . Optimizing therapeutics in the management of patients with multiple sclerosis: A review of drug efficacy, dosing, and mechanisms of action. **Biologics: Targets and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 247–258, 2013. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=18264%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2013753257>>.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L. Immunomodulation in multiple sclerosis: promises and pitfalls. **Current Opinion in Immunology**, v. 49, p. 37–43, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2017.08.013>>.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3871>>.

DUNTAS, L. H.; BENVENGA, S. Selenium: an element for life. **Endocrine**, v. 48, n. 3, p. 756–775, 2015.

FENG, Y. et al. The machinery of macroautophagy. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 24–41, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.168>>.

FLETCHER, J. M. et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 162, n. 1, p. 1–11, 2010.

GHASEMI, N.; RAZAVI, S.; NIKZAD, E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy Citation: Ghasemi N, Razavi Sh, Nikzad E. Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based **therapy**. **Cell J.**, v. 19, n. 191, p. 1–10, 2017.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. **Journal of Neurology**, v. 251, n. 3, p. 261–268, 2004.

GOLD, R.; WOLINSKY, J. S. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 124, n. 2, p. 75–84, 2011.

HACKSTEIN, H.; THOMSON, A. W. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 24–35, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri1256>>.

HAIDER, L. et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. **Brain**, v. 134, n. 7, p. 1914–1924, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. [s.l.] Oxford University Pres, 2015.

HARTUNG, H. et al. **No Title**. [s.l.: s.n.]v. Volume 122

HARTUNG, H. P. et al. **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.: s.n.]

HENEKA, M. T.; MCMANUS, R. M.; LATZ, E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 610–621, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>>.

HERTWIG, L. et al. CX3CR1-dependent recruitment of mature NK cells into the central nervous system contributes to control autoimmune neuroinflammation. v. 155, n. 9, p. 1683–1695, 2015.

HOHLFELD, R. Multiple sclerosis: Human model for EAE? **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2036–2039, 2009.

HUANG, Z.; ROSE, A. H.; HOFFMANN, P. R. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 7, p. 705–743, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2011.4145>>.

JOHANSEN, J. S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, p. 1–11, 2005.

JONES, A.; HAWIGER, D. Peripherally induced regulatory T cells: Recruited protectors of the central nervous system against autoimmune neuroinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, p. 1–8, 2017.

KHAN, F. et al. Effectiveness of rehabilitation intervention in persons with multiple sclerosis: A randomised controlled trial. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 79, n. 11, p. 1230–1235, 2008.

KOUCHAKI, E. et al. Iranian Journal of Basic Medical Sciences Numerical status of CD4 + CD25 + FoxP3 + and CD8 + CD28 - regulatory T cells in multiple sclerosis. **Iran J Basic Med Sci**, v. 17, n. 3, p. 250–255, 2014.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 739–777, 2014. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00039.2013>>.

LANG, T. et al. Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04581-2>>.

LOPES, J. P.; OLIVEIRA, S. M.; SOARES FORTUNATO, J. [Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications]. **Acta medica portuguesa**, v. 21, n. 3, p. 293–302, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674421>>.

LUBINA-DĄBROWSKA, N. et al. Effects of IFN-β1a and IFN-β1b treatment on the expression of cytokines, inducible NOS (NOS type II), and myelin proteins in animal model of multiple sclerosis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 4, p. 325–338, 2017.

LUCCHINETTI, C. et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions. **Annals of Neurology**, v. 47, p. 707–717, 2000.

MA, J. et al. Selenium Attenuates Staphylococcus aureus Mastitis in Mice by Inhibiting the Activation of the NALP3 Inflammasome and NF-κB/MAPK Pathway. **Biological Trace Element Research**, n. 11, 2018. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-018-1591-8?utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=MKEF_USG_Researcher_inbound>.

MARTINON, F. et al. Disvalues.Pdf. v. 10, p. 417–426, 2002.

MCGINLEY, A. M. et al. Th17 cells, $\gamma\delta$ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 87, p. 16–25, 2018.

MCKENZIE, B. A. et al. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 26, p. E6065–E6074, 2018. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1722041115>>.

MIAO, E. .; RAJAN, J. .; ADEREM, A. Caspase-1 induced pyroptotic cell death. v. 243, n. 1, p. 206–214, 2011. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1609.06804>>.

MILLER, D. J. et al. Prolonged myelination in human neocortical evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 41, p. 863–869, 2012.

MILLER, R. H.; BAI, L. Cellular approaches for stimulating CNS remyelination. **Regenerative Medicine**, v. 2, n. 5, p. 817–829, 2007.

MISAWA, T. et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 14, n. 5, p. 454–460, 2013.

MUNÕZ-PLANILLO, R. et al. NIH Public Access. v. 1, n. 3, p. 233–245, 2013.

NELSON, S. M.; LEI, X.; PRABHU, K. S. Selenium Levels Affect the IL-4-Induced Expression of Alternative Activation Markers in Murine Macrophages. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 9, p. 1754–1761, 2011. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.111.141176>>.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

PERON, J. P. S. et al. Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 227, n. 1–2, p. 10–17, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.06.002>>.

PINO, P. A.; CARDONA, A. E. Isolation of Brain and Spinal Cord Mononuclear Cells Using Percoll Gradients. **Journal of Visualized Experiments**, n. 48, p. 8–10, 2011. Disponível em: <<http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2348>>.

POLMAN, C. et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 15, p. 1493–1501, 2006.

RAHMANTO, A. S.; DAVIES, M. J. Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants. **IUBMB Life**, v. 64, n. 11, p. 863–871, 2012.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K. V. Impact of umbelliferone on erythrocyte redox status in STZ-diabetic rats. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 78, n. 3, p. 131–138, 2005.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)>.

- RIDDERSTAD WOLLBERG, A. et al. Pharmacological inhibition of the chemokine receptor CX3CR1 attenuates disease in a chronic-relapsing rat model for multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5409–5414, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1316510111>>.
- RUANE, D. T.; LAVELLE, E. C. The role of CD103+ dendritic cells in the intestinal mucosal immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 2, n. JUL, p. 1–6, 2011.
- RUDICK, R. A. et al. Natalizumab plus Interferon Beta-1a for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 9, p. 911–923, 2006. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa044396>>.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.
- SHAO, B.-Z. et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. NOV, p. 1–9, 2015.
- SILVA, M. F.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S. Determination of Mercury in Fish by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrophotometry Using a Multicommuted Flow Injection Analysis System. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 6, p. 861–864, 2006. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/analsci/22.861?from=CrossRef>>.
- SINGHAL, G. et al. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. SEP, p. 1–22, 2014.
- SLOWIK, A. et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 is neuroprotective after cuprizone-induced CNS demyelination. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 1, p. 80–92, 2015.
- SOBOLEV, O. et al. Biological role of selenium in the organism of animals and humans. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 7, n. 4, p. 462–464, 2018. Disponível em: <[doi: 10.15421/2017_61](https://doi.org/10.15421/2017_61)>.
- SOCHA, K. et al. Dietary habits and selenium, glutathione peroxidase and total antioxidant status in the serum of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2014.
- SOLLEIRO-VILLAVICENCIO, H.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. April, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2018.00114/full>>.
- SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Seminars in Neurology**, v. 36, n. 2, p. 115–127, 2005.
- VIEIRA, A. T. et al. Treatment with Selemax®, a selenium-enriched yeast, ameliorates experimental arthritis in rats and mice. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 10, p. 1829–1838, 2012.
- WEN, H.; TING, J.; O'NEILL, L. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases and did warburg mis inflammation? v. 13, n. 4, p. 352–357, 2012.
- WINTERBOURN, C. C. et al. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. **J. Lab. Clin. Med**, 1975.

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, p. 1–8, 2014.

ZHANG, F. et al. Inhibition of TNF- α induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 2, p. 381–386, 2002.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221–226, 2011.

Apêndices

Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Potencial terapêutico de cisteína selenizada em modelo experimental de esclerose múltipla", Protocolo nº 1114-CEUA, sob a responsabilidade de **Alexandrina Sartori**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 1/9/2018	Término: 31/7/2020
Espécie/linhagem:	Camundongo C57BL/6	
Nº de animais:	252	
Peso:	20g	Idade: 8 semanas
Sexo:	Fêmea	
Origem	Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP CNPJ: 6302530002662 / Código GTA: 35434020469.	

Botucatu, 21 de setembro de 2018.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Instituto de Biociências da Unesp - Câmpus de Botucatu
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250 - Distrito de Rubião Júnior - CEP 18618-689 Botucatu/SP
Tel 14 3880 0851 mail: secda@ibb.unesp.br

Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Criação e manutenção de camundongos da linhagem SJL para pesquisas do Laboratório de Vacinas e Imunomodulação do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu", Protocolo nº 1016-CEUA, sob a responsabilidade de **Alexandrina Sartori**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 30/7/2017	Término: 1/3/2019
Espécie/linhagem:	Camundongo SJL	
Nº de animais:	De 3 a 6 fêmeas e 3 machos, com aumento da ninhada após o acasalamento	
Peso:	Sem previsão	Idade: 8 semanas
Sexo:	Macho e fêmea	
Origem	Biotério do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo/SP	

Botucatu, 21 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Presidente da CEUA



Instituto de Biociências – Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: secda@ibb.unesp.br