



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia**

Bárbara Fernandes Pinto

**EFEITOS NEUROIMUNOLÓGICOS DO TRATAMENTO POR NEBULIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO DIMETIL FUMARATO E
LIPOSSOMAS CONTENDO ANGIOTENSINA-1-7 EM ANIMAIS COM
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte
2022

Bárbara Fernandes Pinto

**EFEITOS NEUROIMUNOLÓGICOS DO TRATAMENTO POR NEBULIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO DIMETIL FUMARATO E
LIPOSSOMAS CONTENDO ANGIOTENSINA-1-7 EM ANIMAIS COM
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fisiologia.

Orientadora: Professora Dra. Juliana Carvalho Tavares

Coorientador: Professor Dr. Remo de Castro Russo

Belo Horizonte
2022

043

Pinto, Bárbara Fernandes.

Efeitos neuroimunológicos do tratamento por nebulização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo dimetil fumarato e lipossomas contendo angiotensina-1-7 em animais com encefalomielite autoimune experimental [manuscrito] / Bárbara Fernandes Pinto. – 2022.

151 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Professora Dra. Juliana Carvalho Tavares. Coorientador: Professor Dr. Remo de Castro Russo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Encefalomielite Autoimune Experimental. 3. Fumarato de Dimetilo. 4. Angiotensinas. 5. Nanoestruturas. 6. Inflamação. I. Tavares, Juliana Carvalho. II. Russo, Remo de Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE N° 366 DE BÁRBARA FERNANDES PINTO

Às 09:00 horas do dia 12 do mês de dezembro de 2022, transmitida pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de Bárbara Fernandes Pinto. A presidência da sessão coube à Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Profa. Dra. Aline Silva de Miranda, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, ICB/Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Frank Silva Bezerra, ICB/Universidade Federal de Ouro Preto, Prof. Dr. Remo de Castro Russo, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, coorientador, e Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: "Efeitos Neuroimunológicos do Tratamento por Nebulização de Nanopartículas Lipídicas Sólidas Contendo Dimetil Fumarato e Lipossomas Contendo Angiotensina-1-7 em Animais Com Encefalomielite Autoimune Experimental". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar APROVADA a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício de Araujo Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 13/12/2022, às 09:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Silva de Miranda, Servidor(a)**, em 13/12/2022, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Carvalho Tavares, Professora do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 23:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Nicolás Muscará, Usuário Externo**, em 15/12/2022, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frank Silva Bezerra, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1946380** e o código CRC **C80DA961**.

*A minha mãe Eliana por seu amor incondicional, ao meu
querido pai Heraldo pelo apoio e ao amore della mia vita
pelo companheirismo*

AGRADECIMENTOS

Agradecer as pessoas que são importantes em nossas vidas é o mínimo que podemos fazer, pois não somos nada sem o apoio de quem amamos.

Primeiramente agradeço a Deus pela força e coragem durante toda esta longa caminhada. Obrigada a Ti Senhor por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Em especial agradeço a minha amada mãe Eliana, pelo incentivo e encorajamento para que eu nunca desistisse dos meus sonhos. Te agradeço mãe por todo o companheirismo e por seu amor incondicional. Você é um exemplo de mulher para mim. Te amo muito.

Ao meu pai Heraldo, pela compreensão, apoio e contribuição na minha formação acadêmica. Obrigada pai por ser o meu maior herói. Te amo.

A minha avó Horandina pelo apoio e a minha querida avó Clores (*in memoriam*) que sempre acreditou no meu potencial e sempre esteve em meu coração. Gostaria muito que estivesse aqui nesse momento tão maravilhoso e vitorioso em minha vida. Saudades eternas!

A minhas irmãs Bruna e Ana Carolina por todo o carinho e incentivo. Agradeço muito a vocês por todas as vezes que tiveram a meu lado, apoiando-me e tranquilizando-me em todos os momentos difíceis dessa jornada. Hoje, com vocês quero compartilhar essa etapa tão especial da minha vida.

Ao meu grande amor Flaron por ter me acompanhado por toda essa longa trajetória. Muito obrigada pelo apoio, companheirismo e pela paciência em todos os momentos. Agradeço por sempre acreditar em meu potencial e por ter se tornado meu porto seguro. Te amo eternamente.

À minha orientadora Juliana, primeiramente por ter me concedido a honra de ser sua aluna de doutorado. Agradeço pelo apoio incondicional prestado, a forma

interessada e extraordinária como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o meu percurso acadêmico e pessoal. Obrigada pela confiança no meu trabalho, pelo respeito, por me ensinar, pela compreensão e pelos sábios conselhos. Você foi mais que uma orientadora, foi e sempre será uma eterna amiga. A você a minha enorme gratidão!

Ao Professor Remo pela oportunidade, conselhos e ensinamentos. Muito obrigada por ter acreditado em meu potencial e pelo apoio incondicional.

À professora Maria da Glória, que foi a percussora neste meu mundo acadêmico. Saiba que você foi a responsável por plantar em mim a sementinha da “curiosidade científica”. Obrigada pelas conversas, companheirismo e apoio. Espelho muito em você a mulher que um dia quero me tornar. Muito obrigada.

Aos professores do Núcleo de Neurociências, André, Bruno, Cleiton, Grace e Márcio pelas ricas contribuições no decorrer deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus colaboradores, Professor Frezard, Professor Robson e Professora Cláudia por toda a contribuição e incentivo. A vocês minha eterna gratidão.

A turma do Núcleo de Neurociências, obrigada por tonar os meus dias mais alegres e por ter me proporcionado momentos agradáveis e inesquecíveis. Agradeço muito a Deus por ter conhecido cada um de vocês.

Ao Mestre Guilherme por ter contribuído para o preparo dos lipossomas e a Mariana por ter me cedido prontamente os peptídeos. Muito obrigada.

Ao Doutor Mostafa por ter realizado comigo muitos dos meus experimentos. Muito obrigada meu querido amigo!

À minha querida sogra Denise que sempre me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos. Agradeço os conselhos e as palavras de carinho.

A minha “best” Izabela Fernanda por sempre estar presente em minha vida em todos os momentos e por sempre confiar no meu potencial. Obrigada Miga.

A minha querida amiga Lorena que foi como um porto seguro e tornou os meus primeiros dias de laboratório mais alegres. Muito obrigada pelos ensinamentos, risadas, conversas e conselhos. Saiba que você foi essencial na minha formação acadêmica.

Aos meus queridos Laura, Ana Luiza, Lorenas, Laila, Gisele, Ana Flávia, Caio, por terem sido as melhores companhias nesse tempo de convivência. Sinto muito a falta de vocês.

Aos meus queridos Fábio, João, Aninha, Patrícia e Virgínia por nunca me deixarem desistir. Vocês foram essenciais na minha trajetória acadêmica e pessoal. O meu muito obrigada!

À Universidade Federal de Minas Gerais, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a realização desse sonho, contribuindo para a minha formação acadêmica.

Às agências financiadoras do presente projeto: CNPq, FAPEMIG e CAPES.

Por fim, agradeço com todo o meu coração à todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização dessa conquista. O meu muito obrigada!

“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado.”

Isaac Newton

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, crônica e progressiva caracterizada por infiltrado inflamatório, gliose, desmielinização e degeneração axonal no sistema nervoso central (SNC). Diversas formas de tratamento têm sido utilizadas para minimizar os sintomas clínicos da EM. Entretanto, muitos desses fármacos são de alto custo, apresentam sérios efeitos adversos e formas inconvenientes de administração, diminuindo a adesão dos pacientes à terapia. Sendo assim, é relevante buscar novas vias de administração e estratégias terapêuticas para o tratamento da EM. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos neuroimunológicos do tratamento por nebulização de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) contendo dimetil fumarato (DMF), e de lipossomas contendo Angiotensina-1-7 (Ang-1-7), em camundongos com encefalomielite autoimune experimental (EAE). O modelo de EAE foi induzido em camundongos C57Bl/6, fêmeas, com 8 a 12 semanas de idade, através da administração subcutânea de emulsão contendo o peptídeo MOG 35-55, *Mycobacterium tuberculosis* e adjuvante completo de Freund (CFA), seguida de injeção i.p. de toxina pertussis. Os grupos experimentais receberam os respectivos tratamentos por nebulização durante 20/21 dias, a cada 72 horas, totalizando 7 administrações. Os tratamentos consistiam na nebulização de: a) solução salina 0,9%, b) SLN vazias, c) SLN com DMF, d) lipossomas vazios, e) Ang-1-7, ou f) lipossomas com Ang-1-7. A cada 72 horas, o peso corporal e o escore clínico foram analisados, e ao final do tratamento foram coletados dados referentes a inflamação do SNC, toxicidade pulmonar e sistêmica. A administração inalatória tanto do DMF em SLN, quanto da Ang-1-7 em lipossomas foram eficazes no tratamento dos animais EAE, melhorando o escore clínico e a resposta inflamatória. Não foi evidenciada toxicidade pulmonar associada ao uso das SLN e dos lipossomas. Pela primeira vez, nossos resultados evidenciam que animais EAE (não tratados) apresentaram inflamação e piora da função pulmonar, e que o DMF em SLN e a Ang-1-7 em lipossomas atenuaram esses efeitos. Em suma, sugere-se que a nebulização das nanoestruturas contendo DMF ou Angiotensina 1-7 pode ser um potencial protocolo terapêutico para o tratamento da EM, visto que contribui para aumentar a efetividade do fármaco.

Palavras-chaves: encefalomielite autoimune experimental; dimetil fumarato; Angiotensina-1-7; nebulização; nanoestruturas; resposta inflamatória.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, progressive, autoimmune disease characterized by inflammatory infiltrates, gliosis, demyelination, and axonal degeneration in the central nervous system (CNS). Several forms of treatment have been used to minimize the clinical symptoms of MS. However, many of these drugs are expensive, have serious adverse effects and inconvenient forms of administration, reducing patient compliance. Therefore, it is important to search for new routes of administration and therapeutic strategies for the treatment of MS. The aim of this study was to evaluate the neuroimmunological effects of nebulization treatment of solid lipid nanoparticles (SLN) containing dimethyl fumarate (DMF), and of liposomes containing Angiotensin-1-7 (Ang-1-7), in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The EAE model was induced in 8- to 12-week-old female C57Bl/6 mice by subcutaneous administration of emulsion containing MOG 35-55 peptide, Mycobacterium tuberculosis and Freund's complete adjuvant (CFA), followed by i.p. injection of pertussis toxin. The experimental groups received the respective treatments by nebulization for 20/21 days, every 72 hours, totalizing 7 administrations. The treatments consisted of nebulization of: a) 0.9% saline solution, b) empty SLN, c) SLN with DMF, d) empty liposomes, e) Ang-1-7, or f) liposomes with Ang-1-7. Every 72 hours, body weight and clinical score were analyzed, and at the end of treatment, data regarding CNS inflammation, pulmonary and systemic toxicity were collected. The inhaled administration of both DMF in SLN and Ang-1-7 in liposomes were effective in treating EAE animals, improving the clinical score and inflammatory response. No pulmonary toxicity associated with the use of SLNs and liposomes was evidenced. For the first time, our results show that (untreated) EAE animals showed inflammation and worsening of lung function, and that DMF in SLN and Ang-1-7 in liposomes attenuated these effects. In summary, it is suggested that nebulization of nanostructures containing DMF or Angiotensin 1-7 may be a potential therapeutic protocol for the treatment of MS, since it contributes to increase the effectiveness of the drug.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis; dimethyl fumarate; Angiotensin-1-7; nebulization; nanostructures; inflammatory response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura ilustrativa dos componentes da barreira hematoencefálica.....	24
Figura 2: Resposta autoimune evidenciada na EM	26
Figura 3: Visão esquemática e atualizada do Sistema Renina-Angiotensina.....	42
Figura 4: Representação esquemática da via direta e indireta da administração nasal de fármacos	46
Figura 5: Imagens representativas das estruturas das nanopartículas sólidas lipídicas e dos lipossomas.....	48
Figura 6: Análise da permeabilidade vascular do baço através da quantificação por espectrometria da concentração de azul de Evans extravasado para o parênquima tecidual.....	54
Figura 7: Análise da concentração cerebral da citocina pró-inflamatórias IL-6	54
Figura 8: Expressão de RORyT na medula espinal e pulmonar dos animais	55
Figura 9: Fotografias demonstrativas da técnica de microscopia intravital	66
Figura 10: Análise da evolução clínica dos animais	73
Figura 11: Análise do comportamento motor.....	75
Figura 12: Análise do comportamento ansioso	76
Figura 13: Análise da permeabilidade vascular do cérebro e medula espinal através da quantificação por espectrometria da concentração de azul de Evans extravasado para o parênquima tecidual.	78
Figura 14: Análise da concentração das citocinas inflamatórias no cérebro e medula espinal através do ELISA	80
Figura 15: Análise da interação leucócito endotélio na microvasculatura medular. .	82
Figura 16: Análise da toxicidade pulmonar	84
Figura 17: Análise do infiltrado inflamatório pulmonar.....	85
Figura 18: Análise do da mecânica pulmonar	86
Figura 19: Análise do da permeabilidade vascular do baço	87
Figura 20: Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de camundongos pertencentes aos grupos experimentais.....	88
Figura 21: Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de camundongos pertencentes aos grupos experimentais.....	89

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Principais fármacos utilizados para o tratamento da EM, suas respectivas vias de administração e principais efeitos colaterais.....	39
Quadro 2: Distribuição dos grupos experimentais	63
Tabela 1: Atributos físico-químicos dos lipossomas	72

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt – Proteína quinase B

ALT – Alanina transaminase

AMPK – Proteína quinase dependente de AMP

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang-1-7 – Angiotensina 1-7

ANOVA – Análise de variância

AT1 – Receptor da angiotensina do tipo 1

AT2 – Receptor da angiotensina do tipo 2

BHE – Barreira hematoencefálica

BSA – Albumina de soro bovino

CD – Grupamento de diferenciação

CEBIO – Centro de Bioterismo

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CFA – Adjuvante Completo de Freund

CHO – Colesterol

DA – Doença de Alzheimer

DMF – Dimetil fumarato

DP – Doença de Parkinson

DSPC – Diestearoil-fosfatidilcolina

DSPE-PEG2000 – Diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietileno glicol 2000

EAE – Encefalomielite autoimune experimental

EBV – Vírus de Epstein-Barr

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ECA 2 – Enzima conversora de angiotensina 2

EM – Esclerose múltipla

EMSR – Esclerose múltipla surto remissiva

FCE – Fluido cérebro espinal

FDA - Administração de Alimentos e Drogas

g – Grama

GWAS – Estudos de associação genômica ampla

H&E – Hematoxilina-eosina

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

H₂CO₃ – Ácido hidrocarbonílico 2

HLA – Antígenos Leucocitários Humanos

i.p. – Intraperitoneal

i.v. – Intravenosa

icv – Intracerebroventricular

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

kg – Quilograma

L – Litros

LPS – Lipopolissacarídeos

M – Molar

MCAO – Oclusão da artéria cerebral média

mg – Miligrama

mg/kg – Miligrama por quilograma

Min – Minutos

CTRL – Controle

SLN – nanopartículas sólidas lipídicas

mL – Mililitro

mm – Milímetros

MMF – Monometil fumarato

MOG – Glicoproteína da mielina de oligodendrócito

MSIF – Federação Internacional de Esclerose Múltipla

NF-κB – Fator nuclear κB

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

NNC – Núcleo de Neurociências

NO – Óxido nítrico

Nrf2 – Fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)

°C – Graus celsius

OPD – Dicloridrato de o-fenilenodiamina

PA – Pressão arterial

PBS – Tampão fosfato salina

PDI – Índice de Polidispersão

pg – Picograma

pH – Potencial hidrogeniônico

PI3K – Fosfoinositídeo 3-quinase

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsufonila

PTX – Toxina Pertussis

RE1F – Receptor de esfingosina-1-fosfato

RM – Ressonância magnética

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

s – Segundos

s.c. – Subcutâneo

SIRT – Sirtuína

SNC – Sistema nervoso central

SRA – Sistema renina angiotensina

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

Th1 – Linfócito T auxiliar do tipo 1

Th17 – Linfócito T auxiliar do tipo 17

TNF- α – Fator de necrose transformador alfa

Treg – Linfócito T regulador

VJC – Vírus John Cunningham

μg – Micrograma

μl – Microlitro

μm – Micrômetro

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA	22
1.1.1 Conceito e aspectos imunopatológicos	22
1.1.2 Causas e aspectos epidemiológicos.....	27
1.1.3 Manifestações clínicas.....	28
1.1.4 Diagnóstico.....	29
1.1.5 Tratamentos.....	30
1.1.5.1 Interferon beta	31
1.1.5.2 Acetato de glatirâmer.....	32
1.1.5.3 Teriflunomida	32
1.1.5.4 Fingolimode	33
1.1.5.5 Natalizumab.....	34
1.1.5.6 Alemtuzumab.....	34
1.1.5.7 Mitoxantrona	35
1.1.5.8 Daclizumab.....	36
1.1.5.9 Ocrelizumab.....	36
1.1.5.10Cladribina	37
1.1.5.11Dimetil fumarato (DMF)	37
1.2 MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL.....	40
1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	41
1.4 RECEPTOR MAS E SUAS FUNCIONALIDADES.....	44
1.5 VIA NASAL DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS	45
1.6 NANOCARREADORES COMO SISTEMAS DE DELIVERY DE DROGAS.....	46
2. CAPÍTULO 2: EFEITOS NEUROIMUNOLÓGICOS DO DIMETIL FUMARATO EM NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS NO TRATAMENTO PO NEBULIZAÇÃO DE ANIMAIS COM ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL	49
2.1 INTRODUÇÃO.....	50
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.2.1 Avaliação da permeabilidade vascular	51
2.2.2 ELISA	51
2.2.3 PCR em tempo real	52

2.2.4	Análises estatísticas	53
2.3	RESULTADOS	54
3.	CAPITULO 3: EFEITOS NEUROIMUNOLÓGICOS DA ANGIOTENSINA-1-7 EM LIPOSSOMAS NO TRATAMENTO POR NEBULIZAÇÃO DE ANIMAIS COM ENCEFALOMIELE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL	58
3.1	INTRODUÇÃO	59
3.2	OBJETIVOS.....	60
3.2.1	Objetivo Geral.....	60
3.2.2	Objetivos Específicos	60
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.3.1	Animais e delineamento experimental	61
3.3.2	Preparo dos lipossomas	61
3.3.3	Indução do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)	62
3.3.4	Tratamentos.....	63
3.3.5	Avaliação da evolução clínica do EAE.....	64
3.3.6	Avaliação do comportamento motor e ansiedade.....	64
3.3.7	Avaliação da permeabilidade vascular	65
3.3.8	Microscopia intravital na microvasculadura medular	65
3.3.9	ELISA	67
3.3.10	Análise do lavado broncoalveolar	68
3.3.11	Avaliação da mecânica respiratória	69
3.3.12	Avaliação das alterações histopatológicas	69
1.1.5.12	Hematoxilina e Eosina (H&E)	70
1.1.5.13	Quantificação das imagens	70
3.3.13	Análises estatísticas	70
3.4	RESULTADOS	72
3.4.1	Atributos físico-químicos dos lipossomas	72
3.4.2	Avaliação clínica	72
3.4.3	Avaliação dos mecanismos imunoregulatórios no SNC	77
3.4.4	Avaliação da toxicidade pulmonar	83
3.4.5	Avaliação da toxicidade sistêmica	86
3.5	DISCUSSÃO	90
4.	CONCLUSÃO GERAL	98

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
6. ANEXO A: ARTIGO PUBLICADO “INHALATION OF DIMETHYL FUMARATE- ENCAPSULATED SOLID LIPID NANOPARTICLES ATTENUATE CLINICAL SIGNS OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS AND PULMONARY INFLAMMATORY DYSFUNCTION IN MICE”	128

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho está dividido em 5 capítulos. O primeiro capítulo fornece uma introdução geral e atual sobre as diversas vertentes que englobam a esclerose múltipla, incluindo os aspectos imunopatológicos e epidemiológicos, manifestações clínicas, diagnóstico e as principais terapêuticas utilizadas. O sistema renina-angiotensina, assim como a via inalatória de administração de fármacos e os sistemas de delivery de drogas também são temas abordados neste capítulo.

No capítulo 2 e 3 apresentamos os resultados do presente estudo que avaliou os efeitos neuroimunológicos de nanocarreadores contendo dimetil fumarato e angiotensina-1-7, respectivamente, em camundongos com encefalomielite autoimune experimental, modelo animal que mimetiza a esclerose múltipla.

O capítulo 5 traz as conclusões gerais e perspectivas para pesquisas futuras, e no capítulo 6 explicitamos a lista de todas as referências bibliográficas citadas ao longo do texto.

1. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Esclerose Múltipla

1.1.1 Conceito e aspectos imunopatológicos

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica, progressiva e autoimune caracterizada por infiltrado inflamatório, gliose, desmielinização e degeneração neuroaxonal no sistema nervoso central (SNC) (Dendrou, Fugger, & Friese, 2015). Essa desordem é capaz de afetar o cérebro, a medula espinal e os nervos óticos, sendo considerada a causa mais comum de incapacidade neurológica de origem não traumática (Liebner et al., 2018).

O timo é um órgão linfoide primário bastante especializado, sendo responsável pelo estabelecimento da tolerância central através da deleção de células T autorreativas. Entretanto, esse processo nem sempre ocorre de maneira eficiente, ocasionando na liberação de células T autorreativas para a periferia. Normalmente, os mecanismos de tolerância periférica mantêm essas células sob controle. No entanto, defeitos na função das células T reguladoras (Treg) e/ou aumento da resistência de células B efectoras e de células T aos mecanismos de supressão, podem quebrar essa tolerância periférica (Dendrou, et al., 2015). Desta forma, linfócitos B e T autorreativos presentes nos órgãos linfoides periféricos podem tornar-se ativados através de diversos processos, como o mimetismo molecular, na qual um peptídeo de um antígeno estranho que se assemelha a uma parte de uma proteína própria do organismo é apresentado a uma célula T, iniciando uma resposta autoimune. Após ativação, células TCD 4 autorreativas se diferenciam em células T helper 1 (Th1) e células T helper 17 (Th17), e juntamente com as células TCD8, linfócitos B e células da imunidade inata, migram para o SNC, causando inflamação e dano tecidual (Dendrou, et al., 2015; Miljković & Spasojević, 2013).

No SNC, enquanto que os macrófagos participam especialmente do processo fagocítico e ativador da resposta imunológica adaptativa, a micróglia além dessas funções, atua também em diversos mecanismos neuroimunológicos, permitindo o desenvolvimento da catástrofe pró-inflamatória. Na EM, a população microglial, caracterizada como células imunes efectoras residentes no SNC, responde rapidamente a mudanças no ambiente do SNC e orchestra uma resposta neuroinflamatória, liberando citocinas pró-inflamatórias e moléculas relacionadas ao

estresse oxidativo, o que desencadeia a neurodegeneração e alteração da transmissão sináptica. Estudo realizado em pacientes com doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e EM, mostrou que a secreção de IL-1 α , TNF- α e C1q (componente 1q do complexo C1 do sistema complemento), pela micróglia ativada, induziu a modificação do fenótipo dos astrócitos para um fenótipo neurotóxico capaz de causar a morte de neurônios e oligodendrócitos (Liddel et al., 2017). Além disso, a desregulação do eixo fractalquina-CX3CR1, eixo promotor da interação neurônio-micróglia confere, apenas a micróglia a capacidade de intervir a resposta neuronal frente ao desbalanço neuroimunológico (Parodi et al., 2015; J. Wang et al., 2019). Em um modelo experimental de desmielinização, no qual os camundongos receberam dieta com cuprizona, dois “clusters” distintos de micróglia foram identificados: um cluster relacionado com a desmielinização (Cst7+Spp1+), e o outro associado ao processo de remielinização (Cybb+Cd74+) (Olah et al., 2012). Por outro lado, sugere-se que polimorfismos em diversos locos gênicos expressos pelas células micrógliais estão associados a um maior risco de desenvolver a EM (Prinz, Jung, & Priller, 2019). Polimorfismos no gene que codifica o receptor fagocítico tirosina quinase Mer (MerTK), um regulador da fagocitose da mielina de neurônios estressados pela micróglia (Neher et al., 2013) conferem um risco aumentado de EM (Beecham et al., 2013).

A barreira hematoencefálica (BHE), constituída principalmente por células endoteliais, membrana basal, pericitos e astrócitos, localiza-se entre o SNC e a circulação sanguínea periférica e tem por função preservar a homeostase do SNC. Essa estrutura constitui uma interface que restringe o transporte desordenado de células e substâncias da circulação sanguínea para dentro do parênquima neural, sendo considerada um importante componente da unidade neurovascular (Figura 1) (Dopkins, Nagarkatti, & Nagarkatti, 2018; Sweeney, Zhao, Montagne, Nelson, & Zlokovic, 2019).

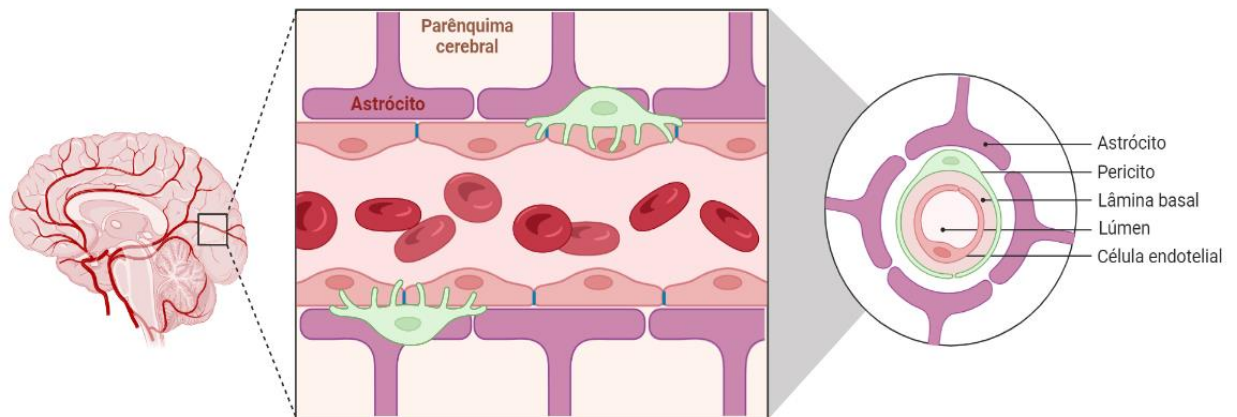


Figura 1: Figura ilustrativa dos componentes da barreira hematoencefálica. Criada pela autora através do Biorender.

Capaz de regular com perfeição o transporte molecular para o CNS por meio de sistemas proteicos transportadores, com exceção para pequenas moléculas gasosas e/ou lipofílicas que se movimentam livremente por difusão, a BHE tem ganhado destaque em se tratando do seu envolvimento em doenças neurológicas, incluindo DA, epilepsia, esclerose lateral amiotrófica, acidente encefálico e EM (Al Rihani et al., 2021; Sweeney, et al., 2019). De fato, na EM a ativação da micróglia, o infiltrado de macrófagos e a disfunção mitocondrial proporcionam o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio no SNC, causando o início de lesões ao longo na BHE (Balasa, Barcutean, Mosora, & Manu, 2021; Cramer, Modvig, Simonsen, Frederiksen, & Larsson, 2015). Dessa forma, há aumento da permeabilidade da BHE levando à transmigração de células imunológicas (macrófagos, células dendríticas, células T, células B e micróglia) e secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas associadas à inflamação, óxido nítrico e metaloproteinases, que culminam na formação de placas escleróticas (lesões), desmielinização e neurodegeneração (Dargahi et al., 2017; Podbielska, O'Keeffe, & Hogan, 2018)

A cascata pró-inflamatória, que contribui para patogenia da EM e da encefalomielite autoimune experimental (EAE), é desencadeada tanto por células da imunidade inata quanto da adaptativa e envolve a produção e liberação de diversas citocinas inflamatórias como IL-1 β pelos macrófagos e monócitos, IL-6 pelos linfócitos B, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelos macrófagos, IL-17 pelas células Th17, interferon gama (IFN- γ) pelas células Th1 e *natural killer*, dentre outras citocinas que participam desta resposta autoimune. Por sua vez, a concentração da interleucina IL-

10, liberada principalmente por células Treg, apresenta-se reduzida em pacientes com EM (Lehmann-Horn, Kinzel, & Weber, 2017; Palle, Monaghan, Milne, & Wan, 2017). Estudo prévio demonstrou que camundongos knockout para IL-10 são mais susceptíveis ao desenvolvimento da EAE, além de adquirirem maior severidade da doença, quando comparados com animais selvagens (WT) (Bettelli et al., 1998). Outro estudo realizado por Zandee e colaboradores (2017) observou que células cerebrais FOXP3 de pacientes com EM produzem IL-10, atuando na supressão da resposta pró-inflamatória (Zandee et al., 2017).

A migração de células inflamatórias para o SNC consiste em uma importante etapa para o desenvolvimento da EM. Ao entrar em contato com as células endoteliais que revestem internamente a parede da microcirculação os leucócitos transmigram através da barreira endotelial e da membrana basal subjacente em um processo denominado diapedese (Dendrou, et al., 2015; Samus, Seelige, Schäfer, Sorokin, & Vestweber, 2018) O recrutamento leucocitário evidenciado na EM, envolve as etapas do rolamento, adesão e a transmigração trans- ou paracelular, desencadeando o processo inflamatório no SNC (Balasa, et al., 2021). Primeiramente, a fase aguda da doença é caracterizada por infiltrado de células imunes mononucleadas como linfócitos, monócitos e macrófagos no SNC. Com o avançar da doença, pode-se evidenciar desmielinização irreversível, cicatriz astrogliótica e perda axonal e neuronal (Figura 2) (A. Hammer, Stegbauer, & Linker, 2017).

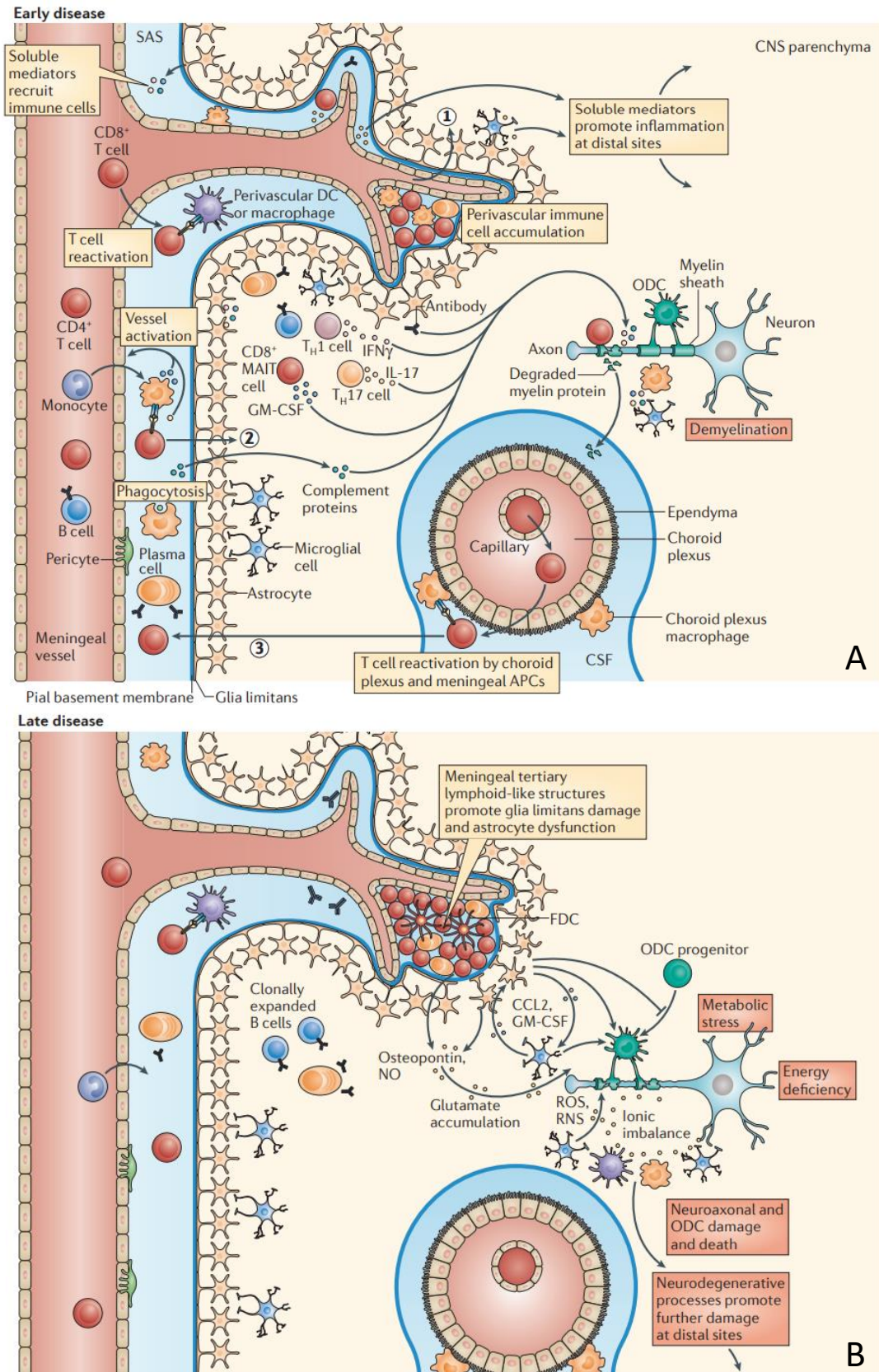


Figura 2: Resposta autoimune evidenciada na EM. Resposta inflamatória observada na fase inicial (A) e na fase tardia da doença (B) (Dendrou, et al., 2015).

1.1.2 Causas e aspectos epidemiológicos

A EM é considerada a mais comum doença crônica desmielinizante (Tillery, Clements, & Howard, 2017), afetando aproximadamente 2.8 milhões de pessoas em todo o mundo, preferencialmente indivíduos com idades entre 20 e 40 anos (Walton et al., 2020). Sua incidência é 2-3 vezes maior nas mulheres (Possa et al., 2017), sendo mais frequente em mulheres brancas, especialmente as descendentes do norte da Europa. Entretanto, a EM também pode afetar crianças, correspondendo a 3-10% dos casos, e pessoas acima de 50 anos de idade, representando entre 2 a 10% (de Chalus, Taveira, & Deiva, 2021; Tillery, et al., 2017).

A prevalência da EM é bastante heterogênea havendo maior incidência na América do Norte (mais de 200/100.000 habitantes) e Europa (143/100.000 habitantes). Segundo a Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF) a prevalência média global da doença corresponde a 36 pacientes a cada 100.000 indivíduos (Walton, et al., 2020). Em 2020, como mencionado acima, aproximadamente 2.8 milhões de pessoas apresentavam a patologia, cerca de 500 mil indivíduos a mais que em 2013 (International Evidence Manager & (MSIF), 2020). No Brasil, a prevalência da EM equivale a 8,69/100.000 habitantes, sendo que a maior incidência foi observada na região sul (27,2/100.000 habitantes), ao modo que, a menor incidência foi registrada na região nordeste (1,36/100.000 habitantes) (Kobelt, Teich, Cavalcanti, & Canzonieri, 2019).

A causa específica da EM é ainda desconhecida, entretanto, alguns fatores genéticos, ambientais e imunológicos têm apresentado correlação com a etiologia da doença. Fatores ambientais, como a exposição a agentes virais e bacterianos, incluindo o vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da herpes humano do tipo 6 e pneumonia por micoplasma, assim como o tabagismo, a deficiência de vitamina D, obesidade na infância e a exposição à radiação UV podem predispor o desenvolvimento da doença (Talanki Manjunatha, Habib, Sangaraju, Yopez, & Grandes, 2022; Thompson, Baranzini, Geurts, Hemmer, & Ciccarelli, 2018). Esses diferentes agentes, por meio do mimetismo molecular ou, no caso dos agentes virais, devido a sua capacidade em manipular a expressão do gene hospedeiro, levando potencialmente à desregulação imune, podem atuar como gatilhos para o desenvolvimento da EM (Tarlinton, Martynova, Rizvanov, Khaiboullina, & Verma, 2020; Yamout & Alroughani, 2018). O

tabagismo por sua vez, aumenta a produção de óxido nítrico (NO), que em concentrações patológicas, pode danificar neurônios e oligodendrócitos (Ghasemi, Razavi, & Nikzad, 2017).

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) identificaram mais de 100 locus gênicos que predispõem o de risco adquirir EM. A maioria desses locus regulam ou codificam genes que controlam as funções das células imunes (Palle, et al., 2017). Os primeiros estudos explorando marcadores genéticos de doenças autoimunes identificaram o locus do antígeno leucocitário humano (HLA), como um locus crítico ligado à susceptibilidade a doenças autoimunes, como a EM (Thompson, et al., 2018). Variações no gene HLADRB1 seguido pelo gene IL7R estão altamente associadas ao desenvolvimento da EM. Outras variações gênicas também estão intimamente relacionadas à patogenicidade da doença, incluindo os genes CXCR5, IL2RA, IL7R, IL7, IL12RB1, IL22RA2, IL12A, IL12B, IRF8, TNFRSF1A, TNFRSF14, TNFSF14, CBLB, GPR65, MALT1, RGS1, STAT3, TAGAP, TYK2, CYP27B1 e CYP24A1 (Jamebozorgi et al., 2021).

1.1.3 Manifestações clínicas

A desmielinização, a perda axonal e a morte neuronal associadas a EM podem ocasionar diferentes sinais e sintomas, dependendo da área acometida. Assim, as manifestações clínicas tendem a variar entre os pacientes, sendo que as mais comuns são distúrbios sensoriais, fadiga, déficits motores, disfunções autonômicas e cerebelares, neurite ótica, alterações cognitivas e depressão (Foschi et al., 2021). A medida que o processo de desmielinização progride, os sintomas se agravam, pois, há uma alteração na velocidade de propagação do potencial de ação ao longo dos neurônios desmielinizados (Tillery, et al., 2017). Nos últimos anos, diversas evidências tem fortemente sugerido a presença de um pródromo para a EM, isto é, um conjunto de sintomas precursores que ocorrem antes do aparecimento da sintomatologia típica da EM. Nesta fase, que geralmente compreende os 5 anos anteriores ao início dos sintomas característicos da EM, os pacientes tendem a usar mais frequentemente os serviços de saúde e são mais propícios a receberem prescrições do que a população em geral. Os sintomas mais comuns no pródromo são fadiga, distúrbios vesicais e

intestinais dor, fibromialgia, enxaqueca e distúrbios do sono (Makhani & Tremlett, 2021).

A EM apresenta quatro diferentes fenótipos: primariamente progressiva, secundariamente progressiva, progressiva com surtos e surto remissiva (EMSR). A forma surto remissiva é a mais comum, afetando 80% dos pacientes. Os sintomas aparecem periodicamente sendo caracterizado por períodos de surto, na qual o paciente vivencia os sintomas, e por período de remissão, sendo os sintomas pouco perceptíveis. Com o avanço da doença a progressão dos surtos torna-se mais evidente (Thati et al., 2015). A forma primariamente progressiva (PP) envolve aproximadamente 15% dos pacientes com EM, sendo que a deterioração neurológica está presente desde o início da doença, ocasionando em acúmulo gradual de incapacidade. Os sintomas preferivelmente ocorrem devido a lesões da medula espinal, ao ponto que o cérebro tende a ter menor incidência lesional. O subtipo secundariamente progressiva (SP) surge após um curso reincidivante inicial da doença, sendo que cerca de 60% dos pacientes com EMSR evoluem para esta forma clínica após, geralmente, um período entre 5 a 20 anos (Ghasemi, et al., 2017; t Hart, Luchicchi, Schenk, Stys, & Geurts, 2021). A forma progressiva com surtos (PS) é considerada a menos comum, correspondendo a apenas 5% dos casos de EM, sendo bastante semelhante a primariamente progressiva, entretanto, apresenta recidivas sobrepostas (Ghasemi, et al., 2017).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da EM é baseado nas características clínicas do paciente, associado a exames complementares que inclui análises de ressonância magnética (RM), do fluido cérebro espinal (FCE) e dos potenciais evocados tanto visuais quanto sensitivos (Dargahi, et al., 2017). A avaliação do FCE consiste em um teste valioso principalmente quando os dados clínicos e as imagens da RM são insuficientes para confirmar o diagnóstico da EM. Através da análise do FCE pode-se verificar a presença de bandas oligoclonais e o aumento da concentração de imunoglobulinas. Os potenciais evocados avaliados por estudos eletrofisiológicos, fornecem informações referentes a lentificação da condutibilidade nervosa, demonstrando a existência de desmielinização axonal. Por sua vez, as lesões no SNC podem ser

constatadas por meio de análise das imagens obtidas pela RM (Ford, 2020; Milo & Miller, 2014).

A comprovação precisa da doença sempre requer cuidadosa exclusão de outras patologias que poderiam explicar melhor os achados clínicos, de imagem e laboratoriais. Assim, testes sorológicos podem ser utilizados para auxiliar na exclusão de outras doenças que mimetizam a EM como o distúrbio do espectro de neuromielite óptica, lúpus eritematoso sistêmico neuropsiquiátrico, vasculite primária do sistema nervoso central e neurosarcoidose (Wildner, Stasiołek, & Matysiak, 2020).

Os critérios de McDonald têm demonstrado precisão, objetividade e precocidade para a confirmação da EM. Os critérios firmados por McDonald em 2017 avaliam o diagnóstico da doença através da disseminação temporal e espacial (Mantero, Abate, Balgera, La Mantia, & Salmaggi, 2018; Schwenkenbecher et al., 2019). A disseminação espacial refere-se a presença de uma ou mais lesões em no mínimo duas áreas do SNC, como nas regiões periventricular, justacortical, infratentorial e/ou na medula espinal. A disseminação temporal refere-se ao desenvolvimento das lesões ao longo do tempo na qual deve constatar uma nova lesão observada pela RM (McNicholas, Hutchinson, McGuigan, & Chataway, 2018). Até o presente momento não existe um biomarcador específico para diagnosticar a EM, entretanto, estudo realizado com modelos de EAE demonstrou que glicosaminoglicanos provenientes do glicocálice de células endoteliais podem atuar com potenciais biomarcadores para inflamação autoimune (DellaValle et al., 2018).

1.1.5 Tratamentos

A EM é caracterizada como uma doença progressiva, neurodegenerativa, incapacitante e irreversível, não apresentando cura. Entretanto, diversas formas de tratamento têm surgido e sido utilizadas com o objetivo de minimizar os efeitos da doença. Embora a terapêutica da EM é considerada a mais avançada ao compararmos com os tratamentos de doenças neurais, como por exemplo, a doença de Alzheimer, ainda não há relatos de casos de cura completa para os pacientes com EM (Masgrau, Guaza, Ransohoff, & Galea, 2017). Atualmente, os principais fármacos utilizados no tratamento da EM são interferon beta, acetato de glatiramer, teriflunomida, fingolimoide, natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrona, ocrelizumab,

cladribine e o dimetil fumarato (DMF), exercendo efeitos imunomodulatórios e imunossupressivos (Quirant-Sánchez et al., 2021; Tillery, et al., 2017; Torkildsen, Myhr, & Bø, 2016). No entanto, muitos desses medicamentos estão associados a severos efeitos adversos, podendo ser fatais. Além disso, a eficácia limitada, incapacidade de reverter totalmente os danos neurológicos, alto custo e inconvenientes métodos de administração também são consideradas as principais barreiras das terapias atuais (Elo et al., 2021; Gajofatto & Turatti, 2018; X. L. Li et al., 2020). Considerando o exposto, fica explícita a necessidade de avaliar novas opções de tratamento mais eficazes, seguras e confortáveis (Quadro 1).

1.1.5.1 Interferon beta

O Interferon beta foi aprovado em 1993 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento das formas recorrentes da EM. O mecanismo de ação deste fármaco está relacionado a capacidade em inibir as células Th17, reduzir a proliferação de linfócitos T, a apresentação de antígeno e a produção de citocinas pró-inflamatórias, e de induzir a apoptose de células T autorreativas, além de alterar a expressão de citocinas e metaloproteinases da matriz e de restaurar a função supressora. Dependendo da formulação, o interferon beta podem ser injetado por via subcutânea com uma frequência de dosagem de geralmente três vezes por semana, ou por via intramuscular sendo administrado a cada 14 dias (Biotti & Ciron, 2018; Callegari, Derfuss, & Galli, 2021; Tillery, et al., 2017).

Os principais efeitos adversos associados ao uso deste medicamento incluem síndrome gripal (50%) e reações locais pós injeção (vermelhidão, hematomas, abscessos, trombozes correspondendo a 30%-60%). Outros efeitos colaterais observados são complicações hepáticas, doença renal, linfopenia e leucopenia (10% - 20%), microangiopatias trombóticas, complicações imunológicas e neuropatias periféricas. Na terapia com interferon beta, os pacientes também podem desenvolver anticorpos neutralizantes contra a droga, o que reduz a eficácia do medicamento, desfavorecendo seu uso (Callegari, et al., 2021). A probabilidade do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes aumenta com o aumento da dose e frequência da administração limitando as doses terapêuticas. Atualmente, aproximadamente 30% dos pacientes descontinuam o tratamento com o fármaco nos primeiros 5 anos, sendo

que 50% dessa população o fizeram devido aos efeitos colaterais (Clerico, Barbero, Contessa, Ferrero, & Durelli, 2007; Tabansky et al., 2015).

1.1.5.2 Acetato de glatirâmer

O acetato de glatirâmer foi inicialmente aprovado pelo FDA em 1996 com o intuito de reduzir a frequência de surtos em pacientes com a forma EMSR. Acredita-se que o fármaco é capaz de induzir e ativar células supressoras de linfócitos T, reduzir a liberação do fator neurotrófico, inibir células T autorreativas específicas para mielina, além de reduzir a frequência de linfócitos B, porém, seu específico mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido. Assim como o interferon beta, sua forma de administração é injetável (subcutânea), limitando a adesão do paciente à terapia (Kuerten, Jackson, Kaye, & Vollmer, 2018; Song et al., 2020).

As desvantagens da terapia incluem reações imediatas pós-injeção (rubor, dor torácica, palpitações, ansiedade, dispnéia, constrição na garganta e/ou urticária) que corresponde a 15%-35% dos casos, podendo manter-se durante os primeiros meses de tratamento, embora seja geralmente transitória e autolimitada. Reações cutâneas à injeção (70%), lipoatrofia (45%) e necrose da pele, também podem ser evidenciados nos pacientes, sendo de extrema importância instruí-los sobre a técnica adequada de administração do fármaco (Ayrignac et al., 2019; Tabansky, et al., 2015). Outros efeitos adversos associados ao longo tempo de uso do acetato de glatirâmer são infecções urinária e do trato respiratório superior, insônia, parestesia e dor (Auricchio et al., 2017).

1.1.5.3 Teriflunomida

O teriflunomida foi aprovado, em 2012, pelo FDA para o tratamento das formas recorrentes da EM. Este fármaco atua como um imunomodulador, apresentando propriedades antiproliferativas e anti-inflamatórias, o que culmina em redução do número de linfócitos ativados no SNC. Mais especificamente, a teriflunomida inibe a enzima diidroorotato desidrogenase, impedindo a síntese das pirimidinas. A inibição dessa enzima, por sua vez, impossibilita a divisão celular das células do sistema imunológico, incluindo os linfócitos T, linfócitos B e a micróglia (Dolati et al., 2017; Faissner & Gold, 2018; Vermersch et al., 2020). O teriflunomida também atua na expansão de células Th2 além de modular células Treg. O fármaco é administrado

pela via oral através de apenas uma única dose diária (Jasiecka-Mikołajczyk & Socha, 2020).

As reações adversas mais comuns associadas à terapia com teriflunomida são reações cutâneas (11%), fadiga, distúrbios sensoriais, infecções leves, cefaléia, diarreia (11%-18%), náusea (10%-14%), alopecia (13%), hipertensão (5%), linfopenia (3%), neuropatia periférica (2%) e aumento dos níveis de alanina transaminase (ALT) (14%). Apesar de sua fácil administração, este medicamento apresenta sérias restrições, sendo totalmente contraindicado em pacientes com doença hepática aguda ou crônica preexistente, assim como, é contraindicado em mulheres com potencial para engravidar devido sua associação com o desenvolvimento fetal incompleto. Assim, as principais desvantagens associadas ao uso da teriflunomida são seus efeitos hepatotóxicos e teratogênicos (Ayrignac, et al., 2019; Dolati, et al., 2017; Tillery, et al., 2017)

1.1.5.4 Fingolimode

O fingolimode foi o primeiro medicamento oral aprovado pelo FDA para tratar pacientes com EMSR. Foi aprovado em 2010, e é categorizado como um modulador do receptor de esfingosina-1-fosfato (RE1F) expresso principalmente na superfície linfocitária, inibindo a saída de linfócitos potencialmente autorreativos dos gânglios linfáticos para o SNC. Tal mecanismo diminui os linfócitos disponíveis no SNC, resultando em redução da inflamação central. Dada a sua natureza lipofílica, o fingolimode pode atravessar a BHE, atuando diretamente nos receptores RE1F também localizados nas células do SNC como neurônios, astrócitos, oligodendrocitos e células endoteliais, exercendo um efeito protetor sobre essas células (Fernández Bargiela, Mondelo García, Giménez Arufe, Vizoso Hermida, & Martín Herranz, 2020; Z. Wang, Kawabori, & Houkin, 2020).

O medicamento é administrado via oral através de uma única dose. Após a administração, as concentrações plasmáticas máximas do fingolimode são atingidas em 12 a 16 horas (Tillery, et al., 2017). As reações adversas mais comuns associadas à terapêutica com fingolimode são linfopenia, náusea (9%-18%), cefaleias (20%), elevação das transaminases hepáticas, diarreia, bronquite, dispneia, influenza, infecções, nasofaringite (20%-50%) e dor nas costas (6%-12%). Outros efeitos colaterais observados são; bradicardia, bloqueio da condução atrioventricular e

hipertensão, assim como, leucoencefalopatia multifocal progressiva, melanoma, e carcinoma basocelular, podendo causar a descontinuação do paciente ao tratamento (Ayrignac, et al., 2019; Maarouf, Boutière, Rico, Audoin, & Pelletier, 2018; Pournajaf, Dargahi, Javan, & Pourgholami, 2022). De fato, o fingolimode é descontinuado por 29% dos pacientes após 2 anos de terapia (Nagy, Kuhle, & Derfuss, 2020). As desvantagens também incluem a exigência de monitoramento da primeira dose, risco de edema macular e potencial elevação das enzimas hepáticas além de ser contraindicado em pacientes com doença cardíaca, (Tillery, et al., 2017).

1.1.5.5 Natalizumab

O natalizumab foi o primeiro anticorpo monoclonal aprovado para o tratamento intravenoso da EM (Tabansky, et al., 2015). Consiste em um anticorpo que bloqueia a interação entre as integrinas $\alpha 4\beta 1$ expressas nos linfócitos com seus ligantes VCAM1 (molécula de adesão celular-vascular-1) presentes nas células endoteliais, inibindo o recrutamento leucocitário através da BHE para o parênquima do SNC (Khoy et al., 2020).

Primeiramente, este fármaco foi aprovado em 2004, entretanto, foi rapidamente retirado do mercado devido a três casos de leucoencefalopatia multifocal progressiva associada a infecção pelo vírus John Cunningham (VJC). Posteriormente em 2006, o natalizumab retornou ao mercado farmacêutico, porém, apresentando diversas restrições (Dolati, et al., 2017). Os efeitos adversos mais comuns observados com a administração deste fármaco são cefaleia (38% - 46%), fadiga (27%), nasofaringite (39%), infecções urinárias (21%), diarreia (19%), reações alérgicas (9%). Além disso, conforme citado anteriormente, o uso do natalizumab também está associado a leucoencefalopatia multifocal progressiva, doença desmielinizante causada pelo vírus John Cunningham (JCV) que, por sua vez, culmina com severos déficits motores, sensitivos e cognitivos (Ayrignac, et al., 2019; Harypursat, Zhou, Tang, & Chen, 2020; Pournajaf, et al., 2022).

1.1.5.6 Alemtuzumab

O Alemtuzumab foi aprovado pela FDA, em 2014, para o tratamento das formas recorrentes da EM. Este medicamento consiste em um anticorpo monoclonal anti-CD52 que se liga a antígenos CD52 expressos na superfície de linfócitos B, linfócitos

T, monócitos, macrófagos, células *natural killer* e neutrófilos, interrompendo sua capacidade de infiltrar no SNC e destruir a mielina. O fármaco é administrado por via intravenosa (Nosher et al., 2021; Sellner & Rommer, 2020).

Muitos efeitos adversos estão associados ao uso desse medicamento, incluindo reações à infusão (90%) e o risco de doenças autoimunes graves, podendo culminar com a morte do paciente (Maarouf, et al., 2018; Tillery, et al., 2017). As reações colaterais mais comuns associadas à terapia com alemtuzumab são erupção cutânea, cefaleia (20% - 50%), vômitos, náusea, diarreia, rubor, dor abdominal, pirexia, nasofaringite, infecção do trato urinário, fadiga (20%), insônia, infecção do trato respiratório superior, infecção por herpes viral, urticária, prurido, distúrbios da glândula tireóide (16% - 18%), infecções fúngicas, artralgia, dor nas extremidades, sinusite, dor orofaríngea, parestesia e tontura. Apesar das possíveis complicações e efeitos adversos graves, em ensaios clínicos, o alemtuzumab foi significativamente mais eficaz na redução do número de surtos e do risco de incapacidade em comparação com o interferon beta (Auricchio, et al., 2017; Ayrignac, et al., 2019; Tillery, et al., 2017).

1.1.5.7 Mitoxantrona

Por quase uma década, o interferon beta e o acetato de glatirâmer foram as únicas drogas validadas para o tratamento da EM. A mitoxantrona, por sua vez, foi aprovada pela FDA, em 2000, e é hoje considerada uma terapia de segunda linha para EM, apresentando efeitos antiinflamatórios bem estabelecidos (Auricchio, et al., 2017; Maarouf, et al., 2018). Este fármaco, administrado de forma intravenosa, demonstrou ser um agente imunossupressor razoavelmente eficaz, exercendo seus efeitos citotóxicos sobre as células B, bem como para os linfócitos T auxiliares e T-citotóxicos. A mitoxantrona também é capaz de reduzir a migração de monócitos para o SNC, além de interferir na eficiência da apresentação de antígeno das células dendríticas (Rommer et al., 2019).

No entanto, seu uso está associado a severos efeitos adversos, como falência cardíaca congestiva, leucemia aguda, distúrbios menstruais (30-50%) e encefalopatia progressiva multifocal. Outros efeitos adversos comuns incluem náusea e vômito (30-40%), alopecia (47%) e leucopenia (19%) (Ayrignac, et al., 2019; Lin et al., 2020; Maarouf, et al., 2018; Samjoo et al., 2021).

1.1.5.8 Daclizumab

O daclizumab é em um anticorpo monoclonal anti-CD25, aprovado em 2016 pelo FDA, para tratar pacientes com EMSR (Papadopoulou, Derfuss, & Sprenger, 2017). Este fármaco é capaz de bloquear o CD25, que consiste em um receptor de IL-2 expresso na superfície das células T, impedindo assim, a ativação de desses linfócitos. O daclizumab é administrado de forma subcutânea uma vez ao mês. Foi originalmente aprovado pelo FDA em 1997 para prevenir a rejeição em transplantes renais, porém seu uso foi interrompido devido à baixa demanda do mercado (Dargahi, et al., 2017; Faissner & Gold, 2018).

Alguns dos efeitos adversos relacionados ao uso do daclizumab são a nasofaringite, infecção do trato respiratório superior, aumentos séricos de enzimas hepáticas, pneumonia, colite ulcerativa, infecção do trato urinário, erupções cutâneas, dermatite, psoríase e efeitos teratogênicos. Além disso, casos fatais foram relatados em estudos clínicos (Preiningerova & Vachova, 2017; Rommer & Zettl, 2018). Este medicamento foi retirado do mercado mundial em 2 de março de 2018 devido a relatos de doenças autoimunes secundárias no SNC, fígado e pele, encefalite e meningoencefalite (Cohan, Lucassen, Romba, & Linch, 2019). Atualmente, o daclizumab é utilizado como uma terapia intravenosa para prevenir a rejeição aguda de órgãos em pacientes pós-transplantados (Sureshkumar & Chopra, 2019).

1.1.5.9 Ocrelizumab

O ocrelizumab consiste em um anticorpo monoclonal anti-CD20 atuando seletivamente na depleção dos linfócitos B. O fármaco foi aprovado pela FDA em 2017 e pela European Medicines Agency (EMA) em 2018 (Margoni, Preziosa, Filippi, & Rocca, 2022). A dosagem recomendada é de 600 mg a cada 6 meses, administrada por via intravenosa em duas infusões de 300 mg com 2 semanas de intervalo para a primeira dose e infusões únicas de 600 mg para as demais doses (Lamb, 2022). Os principais efeitos adversos relacionados ao uso do ocrelizumab são: infecções do trato respiratório superior e inferior, reações locais à infusão, infecções urinárias, nasofaringite, infecções pelo vírus da herpes e úlceras genitais (Cellerino et al., 2021; Ng, Rosenbult, & Tremlett, 2020; Seery et al., 2021).

1.1.5.10 Cladribina

Aprovado pela FDA em 2019, a cladribina consiste em um análogo sintético da adenosina, atuando na inibição da síntese de DNA e na promoção da apoptose linfocitária. Após administração oral, o fármaco é rapidamente absorvido, atingindo concentrações plasmáticas máximas após aproximadamente 30 minutos (Rammohan et al., 2020).

Dor de cabeça (24,2%), linfocitopenia (21,6%), nasofaringite (14,4%), infecções (47%) e náusea (10%) consistem nos mais comuns efeitos adversos do fármaco (Goldschmidt & McGinley, 2021; Hauser & Cree, 2020). Dentre as infecções mais frequentes destaca-se a infecção por vírus da herpes zoster, e infecção pelo vírus da varicela zoster. Entre os pacientes tratados com cladribina, encontrou-se que 1.4 % dos pacientes também apresentaram neoplasmas, incluindo câncer pancreático, ovariano, melanoma e leiomioma uterino benigno (Ayrignac, et al., 2019).

1.1.5.11 Dimetil fumarato (DMF)

O DMF é um medicamento quem tem sido utilizado no tratamento de doenças autoimunes, como a psoríase, desde 1990, e na EM, desde 2013. Esse fármaco, considerado como terapia oral de primeira linha possui a capacidade de modular as células imunológicas, melhorando o curso clínico da EM (Biolato et al., 2021). Primeiramente, o DMF administrado via oral é rapidamente metabolizado em monometil fumarato (MMF), o qual atravessa a barreira hematoencefálica, alcançando o parênquima do SNC (Dubrall et al., 2021).

Estudos tem demonstrado que o DMF promove a diferenciação dos linfócitos T em Th2, potencializando a ativação do fator de transcrição Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2) que, por sua vez, apresenta efeitos citoprotetores em oligodendrócitos, neurônios e células gliais, propriedades antioxidativas, além de participar da regulação da imunidade, contribuindo, dessa forma, com a resposta anti-inflamatória (Piehl, 2021; Zinger et al., 2022). Além disso, esse fármaco pode atuar sobre astrócitos e micróglia inibindo a síntese de mediadores neuroinflamatórios (Parodi, et al., 2015).

Como mecanismo de ação o MMF atua no receptor do ácido hidroxicarboxílico 2 (HCAR2), receptor acoplado à proteína Gi, promovendo seus diversos efeitos no organismo como a ativação da via AMPK/SIRT, causando a inibição do NF-kb e,

consequentemente, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. O HCAR2, também conhecido como receptor do ácido nicotínico é expresso em diversas células do sistema imune, como monócitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, como também nos queratinócitos, epitélio intestinal, epitélio pigmentar da retina, cérebro e no tecido adiposo branco e marrom (Blad, Tang, & Offermanns, 2012; Dubrall, et al., 2021; Parodi, Sanna, Cedola, Uccelli, & Kerlero de Rosbo, 2021). Além disso, sabe-se que o DMF e o MMF são capazes de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF α e IL-6, e de inibir o infiltrado de neutrófilos e macrófagos em áreas cerebrais desmielinizantes (Garcia-Mesa et al., 2021).

Apesar dos efeitos benéficos adquiridos com a utilização do DMF, os diversos efeitos colaterais provocados pela droga ainda têm contribuído pela descontinuidade do tratamento pelo paciente (Al-Khamis, 2016; Phillips et al., 2015). Recente estudo realizado com 400 pacientes com EM evidenciou que um terço dos indivíduos que iniciaram o tratamento com DMF interromperam a terapia dentro de um ano e, no segundo ano de acompanhamento, apenas 43% dos pacientes continuaram com o uso do DMF (Eriksson et al., 2018). Os efeitos adversos mais comumente evidenciados são tosse, rouquidão, sensação de calor, febre, calafrios, dor na região inferior e lateral das costas, dificuldade e/ou dor durante a micção e rubor no rosto, pescoço e braços (31% - 38%). Diversos estudos tem demonstrado que os principais eventos adversos causados pela droga estão diretamente relacionados ao sistema gastrointestinal, incluindo dor abdominal superior (10%), náuseas (11% - 13%) e diarreia (13% - 15%). A linfopenia, leucopenia, presença de cetonas na urina, redução da vitamina D e hipersensibilidade cardiovascular, gastrointestinal, dermatológica e hepática, assim como erupção cutânea, vômitos, dispepsia e leucoencefalopatia multifocal progressiva também são considerados efeitos colaterais do DMF (Al-Khamis, 2016; Ayrignac, et al., 2019; Soelberg Sorensen, 2017).

Quadro 1: Principais fármacos utilizados para o tratamento da EM, suas respectivas vias de administração e principais efeitos colaterais

Fármaco	Ano de aprovação	VA	Redução da taxa anual de surtos *	Principais efeitos adversos
Interferon Beta	1993	s.c	18 - 34%	Complicações hepáticas, e imunológicas, doença renal, linfopenia, leucopenia.
Acetato de glatirâmer	1996	s.c	29 - 34%	Lipoatrofia e necrose da pele, infecções urinária e do trato respiratório superior, insônia, parestesia e dor.
Teriflunomida	2012	v.o	22 - 36%	Distúrbios sensoriais, linfopenia, neuropatia periférica, efeitos hepatotóxicos.
Fingolimode	2010	v.o	48 - 55%	Bradycardia, bloqueio da condução atrioventricular, LMP, linfopenia, melanoma.
Natalizumab	2003	i.v	68 - 73%	LMP, reações alérgicas e congestão da garganta, nariz e ouvidos
Alemtuzumab	2014	i.v	49 - 69%	Infecção do trato urinário, e respiratório, fadiga, insônia, infecção por herpes viral e fúngica, distúrbios da glândula tireóide, parestesia e tontura.
Mitoxantrona	2003	i.v	61%	Falência cardíaca congestiva, leucemia aguda, aminorreia persistente, encefalopatia progressiva multifocal.
Daclizumab	2016	i.v	50 - 54%	Dermatite, psoríase, encefalite inflamatória e meningoencefalite.
Dimetil fumarato	2013	v.o	44 - 53%	Linfopenia, leucopenia, redução da vitamina D e hipersensibilidade cardiovascular, gastrointestinal, dermatológica e hepática.

Ocrelizumab	2017	i.v	24%	Infecções respiratórias e urinárias, nasofaringite e reações locais à infusão.
Cladribine	2017	v.o	55 - 58%	Linfocitopenia, nasofaringite, infecções gerais,

VA: via de administração; s.c: subcutânea; v.o: via oral; i.v: intravenosa; LPM: a leucoencefalopatia multifocal progressiva. * Comparado com placebo.

1.2 Modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental

Para o estudo da EM em animais, modelos de EAE têm sido frequentemente utilizados. Esses modelos de EAE caracterizam-se pelo desenvolvimento de um processo inflamatório, desmielinização, perda axonal e gliose de forma similar às condições clínicas em humanos (Goudarvand et al., 2016). A EAE pode ser induzida em diferentes espécies mamíferas, geralmente através da imunização direta com homogenatos do SNC ou com proteínas da mielina, incluindo glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG), proteína básica de mielina (MBP) ou proteína proteolipídica (PLP) (Chountoulesi & Demetzos, 2020). Para melhorar a reprodutibilidade, outros componentes foram introduzidos no protocolo de sensibilização, como o adjuvante completo de Freund (CFA), que fornece uma liberação lenta do antígeno sensibilizante, e micobactérias (*Mycobacterium tuberculosis*) inativadas, que atuam como um estimulante imunológico. O exato mecanismo de ação da toxina pertussis inativada ainda não está bem esclarecido. No entanto, sugere-se que a toxina aumenta a resposta imunológica através de efeitos diretos na imunidade inata e na BHE, além de poder suprimir a função das células Treg (Lassmann & Bradl, 2017).

O período inicial da EAE é caracterizado pela ativação de células T específicas de mielina em órgãos linfoides periféricos que, por sua vez, são diferenciados em linfócitos Th1 e Th17. Essas células migram para o SNC onde são reativadas via interação com células apresentadoras de antígenos locais (APCs). Esses eventos são seguidos pela secreção de mediadores pró-inflamatórios pelas células T, microglia e astrócitos, que amplificam ainda mais a resposta inflamatória, sustentando o recrutamento de mais células imunes para o SNC (Brambilla, 2019). Com o desenvolvimento da doença, a resposta inflamatória é acompanhada pela

desmielinização e perda axonal, principalmente no pico da doença. As alterações mais pronunciadas são confinadas principalmente à medula espinal, embora um certo grau de desmielinização também é detectada no nervo óptico, no córtex cerebral e no cerebelo (Bernardes et al., 2016; Bjelobaba, Begovic-Kupresanin, Pekovic, & Lavrnja, 2018).

O grau de tecido danificado correlaciona-se com o déficit funcional observado após o início da EAE. A doença segue um curso clínico clássico e previsível, caracterizado pelo pico dos sintomas motores em torno do 14 dia pós imunização. Primeiramente, a paralisia inicia-se pela cauda, adquirindo um padrão ascendente com progressão das patas posteriores para as anteriores, associado a perda de peso (Bjelobaba, et al., 2018; Jelodar, Zare Mirakabadi, Oryan, & Mohammadnejad, 2021; Pilipović et al., 2022; Robinson, Harp, Noronha, & Miller, 2014).

1.3 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina angiotensina (SRA) desempenha um papel chave no controle da pressão arterial (PA) e no balanço hidroeletrólítico (Sparks, Crowley, Gurley, Mirotsoy, & Coffman, 2014). Primeiramente a renina degrada o substrato hepático angiotensinogênio em Angiotensina I (Ang I) que, por sua vez é clivada em Angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA), produzida pelas células justaglomerulares do rim. A degradação da Ang II ocorre por ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), originando dessa forma o subproduto Angiotensina 1-7 (Ang-1-7) (Paz Ocaranza et al., 2020). A Ang-1-7 também pode ser derivada da degradação da Angiotensina 1-9 (Ang-1-9) através da ação da ECA. A representação esquemática deste importante sistema está representada na figura 3.

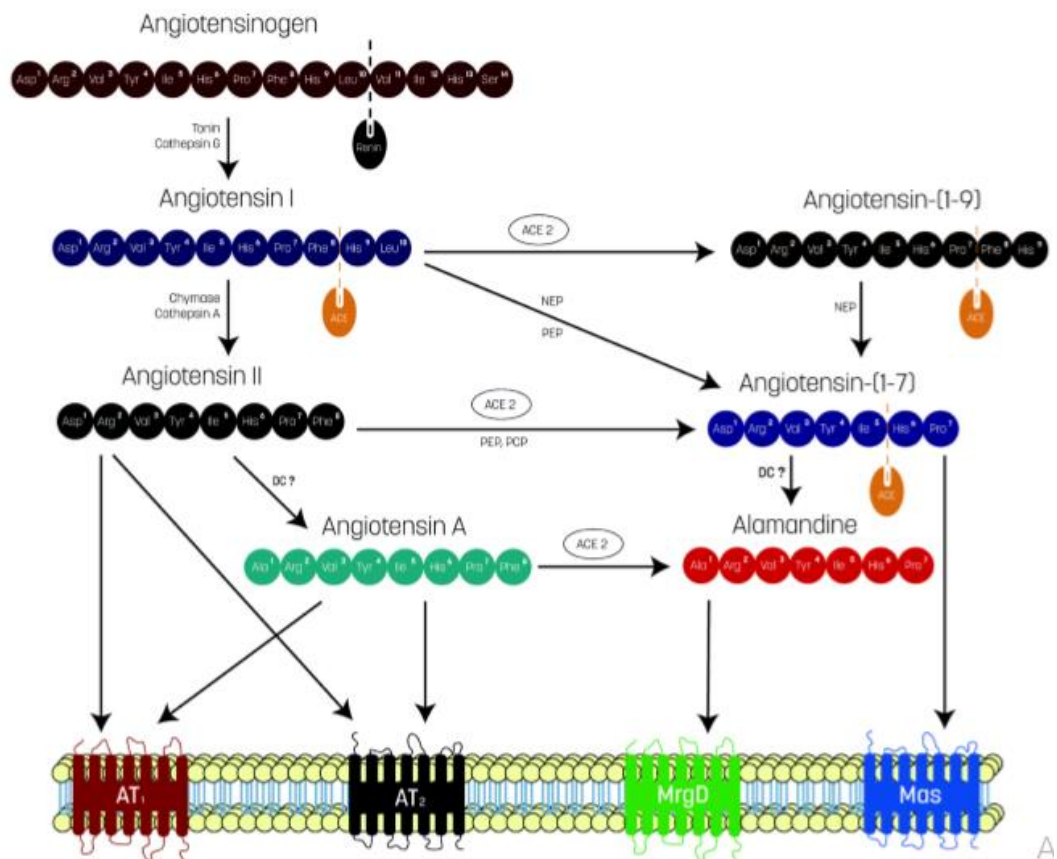


Figura 3: Visão esquemática e atualizada do Sistema Renina-Angiotensina. ACE: enzima conversora da angiotensina; ACE 2: enzima conversora da angiotensina 2; AT1: receptor da angiotensina do tipo 1; AT2: receptor da angiotensina do tipo 2; Mas: receptor Mas; MrgD: receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas - tipo D; DC: descarboxilase; NEP: endopeptidase neutra (neprilisina); PEP: prolilendopeptidase; e PCP, prolil carboxipeptidase (Almeida-Santos, Kangussu, & Campagnole-Santos, 2017).

A Ang II, consiste em um dos principais peptídeos deste sistema, sendo capaz de se ligar aos receptores da angiotensina do tipo 1 (AT1) e aos receptores da angiotensina do tipo 2 (AT2), causando diversas respostas no organismo, incluindo no coração, rins, vasculatura, cérebro e no sistema imunológico (Miyajima, Kosaka, Kikuchi, & Oya, 2015). Esse peptídeo vasoativo também atua como um potente mediador pró-inflamatório, ativando a cascata do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), importante citocina fibrótica e apoptótica (J. S. Kim et al., 2018). De fato, o eixo ECA/ Ang II/ receptor AT1 está relacionado a inúmeras ações inflamatórias, incluindo a produção de radicais livres, ativação de proteínas quinases e fatores de transcrição nuclear, recrutamento de células inflamatórias e estimulação da

expressão, síntese e liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Simões e Silva, Silveira, Ferreira, & Teixeira, 2013). Por sua vez, a atividade exacerbada desse eixo está envolvida na patogenia de diversas doenças cardiovasculares, assim como está associada ao aumento do estresse oxidativo, dano isquêmico cerebral, prejuízo cognitivo e inflamação cerebral (Gebre, Altaye, Atey, Tuem, & Berhe, 2018; Kangussu et al., 2015). Alguns estudos têm demonstrado que o bloqueio do receptor AT1 é capaz de atenuar os déficits cognitivos evidenciados na DA, DP e em outras patologias que cursam com prejuízo cognitivo (Gebre, et al., 2018; Jackson, Eldahshan, Fagan, & Ergul, 2018).

Conforme especificado anteriormente, a Ang-1-7, proteína derivada primariamente da ação ECA 2 sobre a Ang II, atua no receptor Mas, sendo responsável por contrabalancear a ação da Ang II. Dessa forma, como é bastante descrito na literatura, o eixo ECA2/ Ang-1-7/ receptor MAS desencadeia um papel essencial em antagonizar os efeitos da Ang II, apresentando fortes características cardioprotetoras (Ziaja, Urbanek, Kowalska, & Piastowska-Ciesielska, 2021). Diversas evidências tem demonstrado o papel anti-inflamatório e antioxidante do eixo ECA 2/ Ang-1-7/ Receptor Mas em várias condições patológicas, incluindo modelos animais de colite (Khajah, Fateel, Ananthalakshmi, & Luqmani, 2017), asma (Magalhaes et al., 2018), esofagite aguda de refluxo (Pawlik et al., 2014) e hipertensão pulmonar (Shenoy et al., 2014). A Ang-1-7 também tem sido alvo de estudo como terapia anticancerígena devido as suas características antiproliferativas e antiangiogênicas (Schere-Levy et al., 2022).

Além do papel protetor na regulação cardiovascular, a Ang-1-7 pode exercer efeitos imunoregulatórios no SNC. Estudos prévios têm demonstrado que a Ang-1-7 apresenta efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes e vasodilatadores, além de desempenhar um papel neuroprotetor em animais submetidos ao protocolo de acidente vascular encefálico, como o de reduzir o volume de infarto cerebral (Arroja et al., 2019; Bennion et al., 2018; Padda, Shi, Lo, Zhang, & Chan, 2015). Estudo prévio sugeriu a existência de uma relação entre a redução da atividade do eixo ECA2/ Ang-1-7/ receptor Mas em condições autoimunes, incluindo a EM. Neste mesmo estudo foi observado que animais knockout para o receptor Mas, quando submetidos a indução da EAE, apresentaram aumento exacerbado do infiltrado de macrófagos na medula espinal avaliada através da técnica de imunohistoquímica, quando comparados com

animais WT com EAE. Além disso, a deficiência do receptor Mas também resultou em aumento da desmielinização e perda axonal na medula espinal prejudicando o curso clínico da doença (Anna Hammer et al., 2016). No entanto, a exata função e mecanismo de ação da Ang-1-7 em doenças neurodegenerativas autoimunes ainda não estão bem elucidados (Goldstein et al., 2016).

1.4 Receptor Mas e suas funcionalidades

O receptor Mas consiste em receptor transmembrana acoplado à proteína G, composto por 7 domínios, na qual a Ang-1-7 é capaz de atuar (A. Hammer, et al., 2017; Karnik et al., 2015). No camundongo, o receptor Mas está presente em diferentes tecidos e células como nos rins, baço, testículos, glândulas adrenais, fibroblastos cardíacos, cardiomiócitos, células do sistema vascular, na retina ocular de humanos e na artéria aorta (Akhtar et al., 2015; Anna Hammer, et al., 2016; Vaajanen, Kalesnykas, Vapaatalo, & Uusitalo, 2015). Especificamente no cérebro, o receptor Mas foi evidenciado em neurônios do hipocampo, córtex cerebral, giro denteado, tubérculo olfativo e o bulbo olfatório de roedores (Gironacci, Vicario, Cerezo, & Silva, 2018; Karnik, et al., 2015; Prasad, Verma, & Li, 2014), assim como, no epitélio do plexo coroide, endotélio cerebral, hipotálamo, amígdala, gânglios da base e no córtex piriforme (Freund, Walther, & von Bohlen und Halbach, 2012; Gebre, et al., 2018) O receptor Mas também já foi identificado em diversas células do sistema imunológico tais como as células dendríticas derivadas da medula óssea de ratos (Nie et al., 2009), eosinófilos murinos e de humanos (Magalhaes, et al., 2018), macrófagos (Akhtar, et al., 2015; Anna Hammer, et al., 2016; Zaidan et al., 2022) e micróglia (Rivas-Santisteban et al., 2021), sugerindo a relação do receptor Mas em processos inflamatórios.

De forma geral, a ativação do receptor Mas pela Ang-1-7 estimula a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais através do eixo fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K)/ Proteína quinase B (Akt), o que causa, inibição do crescimento celular e bloqueio do AT1 (Bian et al., 2013). A ausência funcional do receptor Mas associa-se a uma resposta inflamatória cerebral exacerbada após desafio com lipopolissacarídeos (LPS) por intensificar o processo de adesão leucocitária, favorecendo o recrutamento de neutrófilos e monócitos, aumentando os mediadores

cerebrais e sanguíneos no cérebro e medula e modulando a ativação de neutrófilos e monócitos na medula óssea (Oliveira-Lima et al., 2015).

1.5 Via nasal de administração de fármacos

A via de administração dos fármacos representa um importante fator que contribui para a adesão do paciente ao tratamento. Por sua vez a via inalatória consiste em uma forma alternativa de administração de fármacos principalmente para o SNC, apresentando diversas vantagens em comparação com as formas intravenosas, orais ou subcutâneas (Ueno et al., 2019). Primeiramente, a entrega inalatória de moléculas proporciona um acesso direto ao SNC, através da via olfativa ou trigeminal, sem necessariamente ter que transpor a BHE. Em segundo lugar, a exposição de órgãos periféricos e tecidos ao fármaco geralmente é bastante reduzida, atenuando dessa forma, a toxicidade sistêmica e, conseqüentemente, os possíveis efeitos adversos. Em terceiro lugar, a via inalatória evita o metabolismo hepático de primeira passagem, aumentando a biodisponibilidade farmacológica. E em último lugar, do ponto de vista clínico e terapêutico, é bem reconhecido que a administração inalatória de drogas consiste em uma forma fácil de administração por não ser invasiva (Gomes et al., 2018; McClure et al., 2015; Ueno, et al., 2019).

Por meio da administração nasal os fármacos podem atingir o SNC através das vias diretas ou indiretas. A via direta envolve os bulbos olfatórios e o nervo trigêmeo, dando acesso direto ao cérebro (Shobo et al., 2018). O bulbo olfatório é projetado para diferentes regiões do cérebro, como o córtex piriforme, a amígdala e o hipotálamo, sendo útil para a administração direta de drogas ao cérebro, através do transporte anterógrado neuronal. Por sua vez, o nervo trigêmeo, quinto nervo craniano, apresenta três ramos; nervo oftálmico, nervo maxilar e nervo mandibular, sendo responsável pela sensibilidade da cavidade nasal. Os nervos oftálmicos e maxilares inervam a mucosa nasal e, também por meio do transporte retrógrado, são capazes de transportar substâncias diretamente para o SNC (Khan, Liu, Khan, & Zhai, 2017; McClure, et al., 2015). A via indireta, por outro lado, transporta as drogas para o cérebro através do sistema linfático (Figura 4) (Shobo, et al., 2018). Recente estudo demonstrou que a inalação de Dizocilpine, um antagonista não competitivo do receptor N-metil D-Aspartato, exacerbou a atividade locomotora e comportamental em

animais saudáveis (Ueno, et al., 2019). Outro estudo clínico de fase 3 também foi capaz de comprovar a eficácia da via inalatória em reduzir a sintomatologia de pacientes com DP durante os períodos de OFF, através da inalação da levodopa em pó (LeWitt et al., 2019). Entretanto, os exatos mecanismos pelos quais as drogas administradas pela via nasal têm acesso ao SNC ainda não estão bem elucidados na literatura.

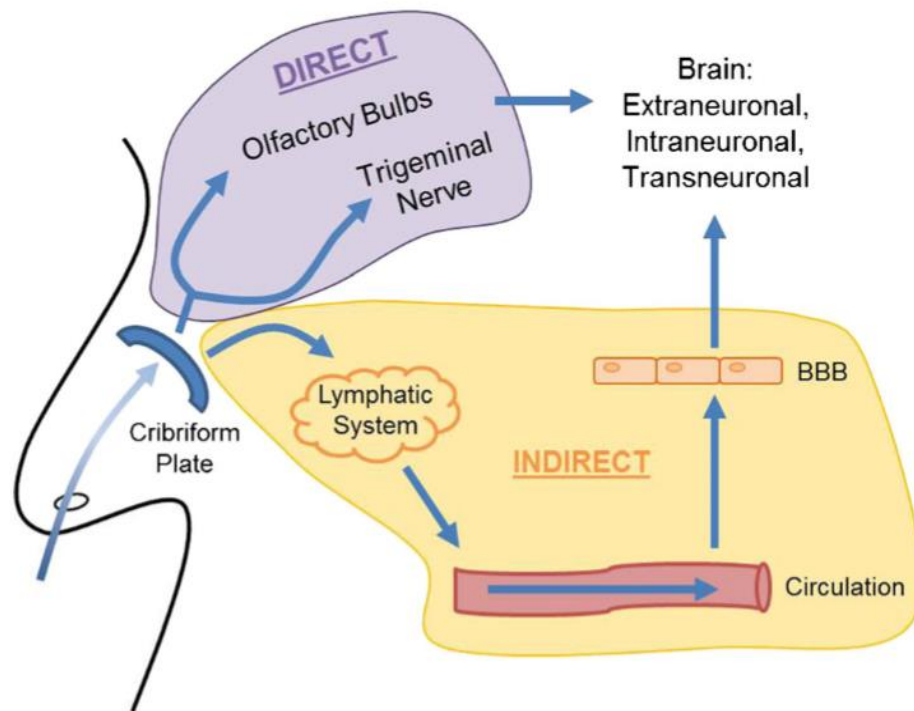


Figura 4: Representação esquemática da via direta e indireta da administração nasal de fármacos (Meredith, Salameh, & Banks, 2015).

1.6 Nanocarreadores como sistemas de *delivery* de drogas

Os recentes avanços na nanomedicina permitiram o desenvolvimento de diferentes tecnologias em nanoescala para auxiliar tanto no diagnóstico quanto na terapia de diversas doenças. As nanopartículas são estruturas com dimensões em nanoescala que apresentam a capacidade de atuar como transportadores de substâncias. Esses nanocarreadores podem transportar uma variedade de moléculas, incluindo anticorpos, RNA, agentes de contrastes, proteínas e peptídeos. Existe diversos tipos de nanopartículas como os nanocristais, nanotubos, nanopartículas poliméricas, nanofios, hidrogéis, dendrímeros e as nanopartículas estruturadas por lipídeos (Khosa, Reddi, & Saha, 2018; Leyva-Gómez et al., 2018; Pandey & Dureja,

2018). Devido suas vantagens, diversos tipos de nanopartículas foram aprovados pelo FDA e têm sido utilizados para o tratamento de inúmeras doenças, incluindo câncer pancreático, leucemia e amiloidose por transtirretina (Almeida, Nag, Rogers, & Delehanty, 2020).

Os transportadores a base de lipídeos podem ser divididos em várias categorias e têm sido utilizados para o tratamento de doenças cerebrais nos últimos 30 anos. Os principais componentes deste tipo de nanoestrutura são os niosomos, transferossomos, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) e os lipossomas (Figura 5) (Qamar et al., 2019). Essas nanoestruturas, devido seu pequeno tamanho e sua composição lipídica, possuem uma capacidade inerente de atravessar a BHE (Tapeinos, Battaglini, & Ciofani, 2017).

As SLN consistem em nanosistemas constituídos principalmente por lipídios sólidos a temperatura ambiente, emulsificadores e água. Com um diâmetro entre 50 a 1000 nm, as SLN são biocompatíveis, e biodegradáveis, podendo carrear tanto componentes hidrofílicos quanto hidrofóbicos (Aldawsari & Singh, 2020; Zielińska et al., 2019). Além de poderem ser preparadas em larga escala, as SLN não necessitam da utilização de solventes orgânicos e possuem baixo custo (B. Pinto et al., 2022; Scioli Montoto, Muraca, & Ruiz, 2020). São estáveis à temperatura corporal humana e apresentam baixo risco de toxicidade aguda e crônica (Musielak, Feliczak-Guzik, & Nowak, 2022).

Por sua vez, os lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas que isolam compartimentos aquosos internos do meio externo. Eles podem encapsular substâncias hidrófilas e/ou lipofílicas no compartimento aquoso interno e na membrana, respectivamente (Fontes et al., 2018; Khosa, et al., 2018). Esses sistemas unilamelares apresentam um diâmetro que varia entre 10 a 1000 nm e compreendem a primeira geração de nanoestruturas lipídicas que foram utilizadas para administração parenteral de drogas (Tapeinos, et al., 2017). Como vantagens, os lipossomas são estruturas não tóxicas, não imunogênicas, não carcinogênicas, não trombogênicas e biodegradáveis (Ambhore et al., 2017).

Nanosistemas lipídicos tem se tornado em um interessante método de direcionamento de fármacos devido sua capacidade de prevenir a rápida degradação da substância incorporada, promover a penetração através da BHE, além de apresentar alta eficiência de carregamento e alta biocompatibilidade (Ambhore, et al.,

2017; Fontes, et al., 2018). Essas estruturas também possuem habilidade de encapsular e distribuir grandes quantidades de fármacos, assim como podem incorporar diferentes ligantes em sua superfície (Lai, Fadda, & Sinico, 2013) podendo ser utilizadas por todas as vias de administração (Cunha, Almeida, Amaral, Lobo, & Silva, 2017; Montenegro et al., 2011) . Esses nanosistemas podem ser transportados para o cérebro através de diferentes vias, incluindo, transporte passivo, fusão membranar com as membranas endoteliais, endocitose e transporte intraneuronal (Battaglia et al., 2018; R. Li et al., 2022; Pandian, Vijayakumar, Murugesan, & Kunjiappan, 2022; B. Pinto, et al., 2022).

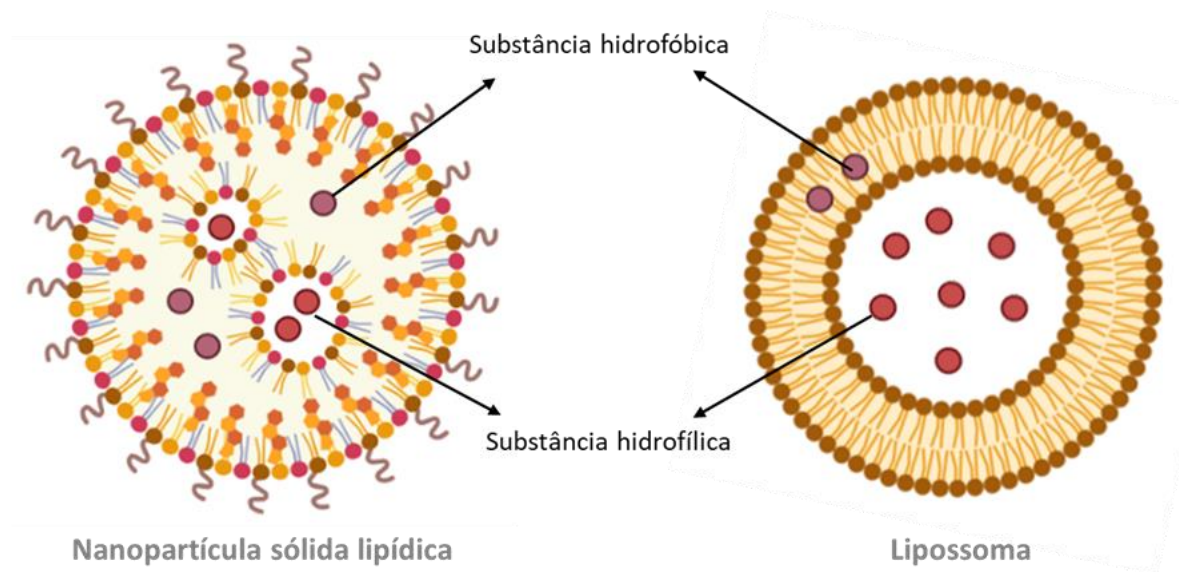


Figura 5: Imagens representativas das estruturas das nanopartículas sólidas lipídicas e dos lipossomas. Criada pela autora através do Biorender.

Diversos estudos têm empregado o uso de diferentes substâncias encapsuladas por nanopartículas lipídicas para o tratamento de doenças do SNC, incluindo modelos animais de isquemia, DA e DP (Al-Ahmady et al., 2022; Andrade, Ramalho, Loureiro, & Pereira, 2022; Binda et al., 2018; Dudhipala & Gorre, 2020; Vakilinezhad et al., 2018). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos dessas nanoestruturas para a terapia nasal de doenças do SNC.

2. CAPÍTULO 2: EFEITOS NEUROIMUNOLÓGICOS DO DIMETIL FUMARATO
EM NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS NO TRATAMENTO PO
NEBULIZAÇÃO DE ANIMAIS COM ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL

2.1 Introdução

Neste capítulo serão apresentados os dados referentes ao estudo que avaliou o papel do DMF encapsulado por SLN administrado por via inalatória em modelo animal de EAE. Vale destacar que grande parte dos dados foram recentemente publicados na revista *Clinical Science* (Pinto, Bárbara Fernandes et al. "Inhalation of dimethyl fumarate-encapsulated solid lipid nanoparticles attenuate clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis and pulmonary inflammatory dysfunction in mice." *Clinical science* (London, England: 1979) vol. 136,1 (2022): 81-101. doi:10.1042/CS20210792), sendo que a metodologia, os resultados e a discussão estão descritos na íntegra no ANEXO 1. Os resultados que não foram publicados, incluindo a permeabilidade vascular do baço, níveis cerebrais e pulmonares de IL-6 e a expressão gênica de ROR γ t no parênquima cerebral e pulmonar estão apresentados na próxima secção.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Avaliação da permeabilidade vascular

Para a avaliação da permeabilidade vascular, utilizou-se o corante Azul de Evans que, devido a sua capacidade de se ligar irreversivelmente à albumina, permite mensurar o extravasamento plasmático conforme descrito previamente (Lacerda-Queiroz et al., 2011; Matos et al., 2022; Saria & Lundberg, 1983). Primeiramente, os animais foram anestesiados via i.p. com uma mistura de ketamina (60 mg/kg, Laboratório Cristália, SP), e xilazina (10 mg/kg, *Rompun®*, Bayer). Em seguida, administrou-se 200 µL de Azul de Evans 2% no plexo retro-orbital, e ao final de uma hora, os animais foram sacrificados, sendo realizada a perfusão transcardíaca. Os baços foram retirados e colocados em placa de Petri aberta para secagem por 48 horas em estufa a 40° C. A seguir, as amostras foram pesadas e foi acrescentado ao tecido 1,0 mL de formamida, para extração do corante, permanecendo 48 horas em temperatura ambiente. O corante extraído do tecido foi quantificado por espectrofotometria (620 nm), e a curva-padrão determinada a partir das seguintes concentrações: 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625 e 0.3125 µg/mL.

2.2.2 ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado para mensurar os níveis das citocinas IL-6 em homogenatos de cérebro dos camundongos após o período experimental de 21 dias, conforme protocolo de fabricação (R&D system). Resumidamente, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (60mg/kg, Dopalen, Paulínea, Brasil) e Xilasina (10mg/kg, Anasedan, Paulínea, Brasil). Os tecidos cerebrais foram extraídos por meio de incisões a partir do forame magno, pesados e homogeneizados em solução adequada para extração de citocinas, contendo inibidor de protease preparada a partir de uma solução de PBS 1x (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 µl de aprotinina). Para cada 100 mg de tecido foi adicionado 1mL de solução para o processo de homogeneização. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido,

aliquotado e estocado a -20°C até o uso. O kit ELISA para dosagem de IL-6 foi obtido pela R&D Systems (Minneapolis, USA). A leitura das placas foi feita utilizando um leitor de placas a 492 nm (Thermo Plate reader). A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente, sendo que a concentração mínima detectável de IL-6 foi equivalente a 31.25 pg/ml (Bernardes et al., 2013; Oliveira-Lima, et al., 2015).

2.2.3 PCR em tempo real

O RNA total a partir de 10 mg de tecido foi isolado utilizando-se o kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi posteriormente tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific), e em seguida, 1 μg do RNA total foi então reversamente transcrito por meio do protocolo de alta capacidade cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific). Os cDNAs, construídos a partir do RNAs extraídos das amostras foram usados para avaliar a expressão gênica da proteína RORyT. Para isso, foi realizado o ensaio de PCR em tempo real com um volume final de 10 μl contendo: 1 μl de cDNA diluído (1:5); 5 μl de PCR Master Mix (Taqman® Gene Express Master Mix); 0,5 μl de TaqMan 20x primer (Applied Biosystems, E.U.A.), e água livre de nucleotídeos. A reação ocorreu em um 7500 Fast Termociclador (Applied Biosystems) seguindo as condições de ciclagem padrão. Cada amostra foi aplicada em duplicata, e os dados foram analisados usando o software 7500 v2.0.6 (Applied Biosystems, U.S.A.). Foram utilizadas sondas TaqMan murino específicas para a determinação da expressão gênica do 18S RNA ribossomal (18s-Hs9999999901 s1) (GeneBank Número de adesão:X03235.1) e RORyT (Mm00441139_m1), conforme descrito anteriormente (Russo et al., 2018).

A quantificação relativa dos genes foi determinada pela normalização dos valores Ct obtidos em cada amostra, utilizando primers para a gene constitutivo 18S ribossomal RNA. Valores de Ct maiores que 35 foram considerados indetectáveis. Os níveis relativos de expressão foram definidos usando o método 2-Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

2.2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 8.0 (San Diego, CA) e apresentados como média \pm SD. Para variáveis paramétricas evidenciadas pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado o One-away ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Para as variáveis não paramétricas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste Dunn. Foi considerado o nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

2.3 Resultados

A permeabilidade vascular do baço foi avaliada com o objetivo de analisar se a administração inalatória do DMF encapsulado poderia estar associado a algum efeito adverso a nível sistêmico. Nossos resultados não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (Figura 6).

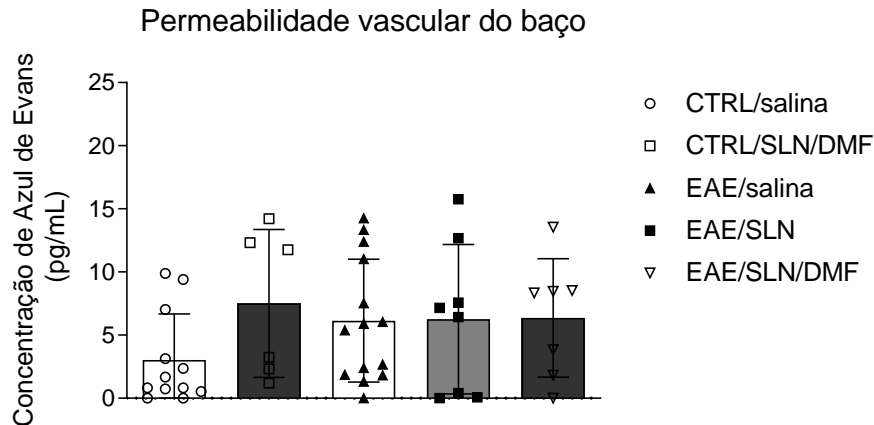


Figura 6: Análise da permeabilidade vascular do baço através da quantificação por espectrometria da concentração de azul de Evans extravasado para o parênquima tecidual. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Além das citocinas IL-10, TNF- α e IL-17, foi também avaliada a concentração da citocina IL-6 no parênquima cerebral. Não foi observado diferenças estatísticas significativas entre os grupos em estudo (Figura 7).

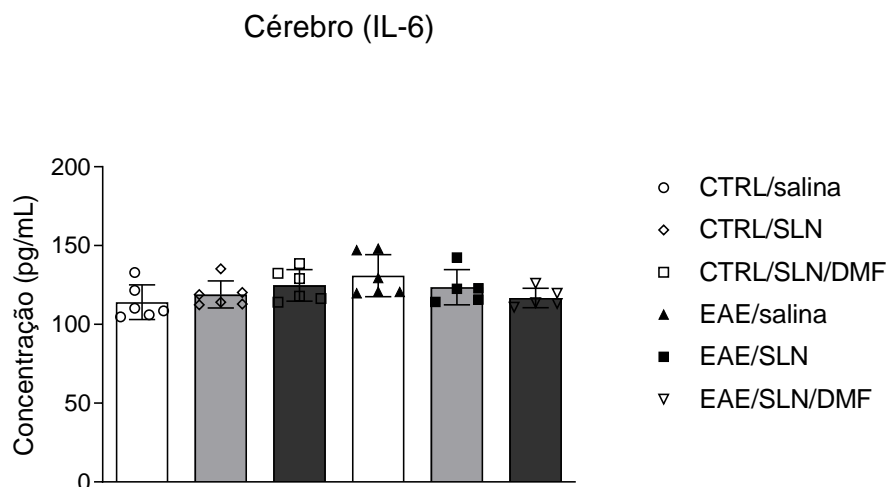


Figura 7: Análise da concentração cerebral da citocina pró-inflamatórias IL-6. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Com o objetivo de determinar a mobilização de população de células Th17 no parênquima medular e pulmonar, avaliamos a expressão de ROR γ T, fator de transcrição nuclear presente em células Th17, no 21º dia pós indução (dpi). Nossos resultados evidenciaram uma redução da expressão de ROR γ T tanto na medula espinal quanto no pulmão dos animais pertencentes ao grupo EAE/salina quando comparado com o grupo CTRL/salina, sendo que a o tratamento com DMF em SLN foi capaz de reverter esse efeito a nível medular (Figura 8).

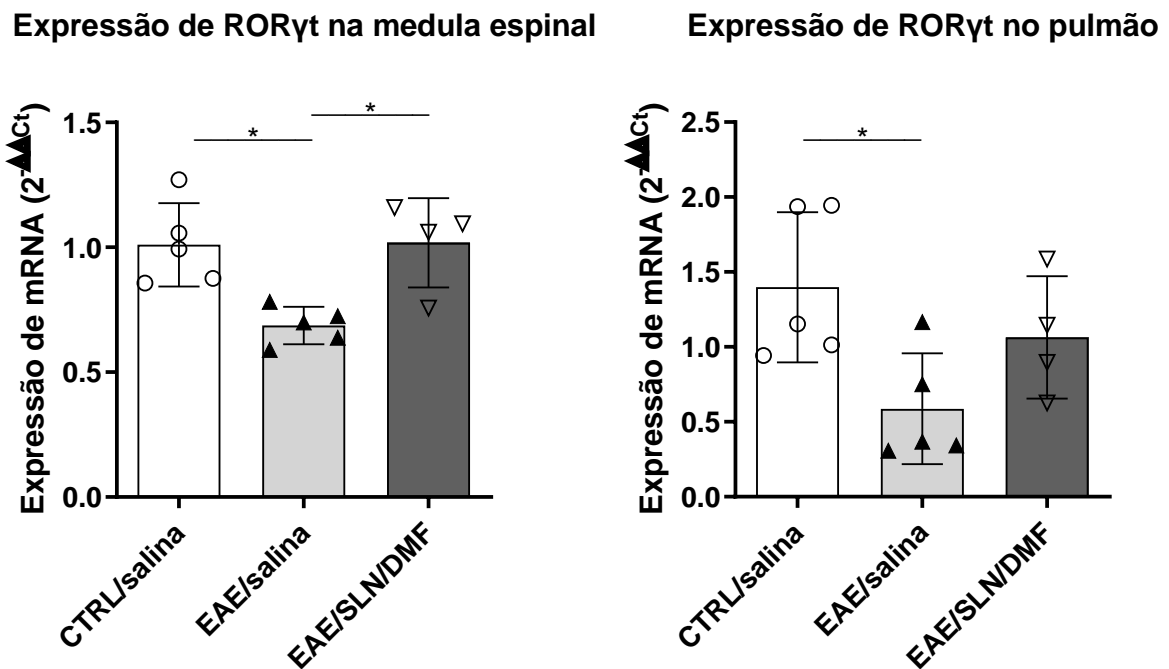


Figura 8: Expressão de ROR γ T na medula espinal e pulmonar dos animais. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

2.4 Discussão

A avaliação da permeabilidade vascular do baço foi realizada com o intuito inicial de verificar possível toxicidade sistêmica associada a administração inalatória do DMF encapsulado em SLN. Conforme demonstrado, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, sugerindo que a terapêutica em estudo não é capaz de causar efeitos adversos sistêmicos a nível do baço. No entanto, este resultado, per se, não exclui a ausência de inflamação sistêmica relacionada à doença em questão, visto que, no pulmão foi observado um aumento da permeabilidade vascular, associado a um aumento das concentrações pulmonares de algumas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17 e TNF- α , além da presença exacerbada de células imunológicas, incluindo neutrófilos, macrófagos e linfócitos, e de inflamação parenquimal, perivascular e peribronquial nos animais EAE, sugerindo a presença de inflamação a nível sistêmico (Secção “Resultados” do ANEXO A). Concomitantemente, foi também possível observar que o tratamento com DMF encapsulado por SLN foi capaz de reverter esta resposta inflamatória.

Em se tratando das concentrações cerebrais da IL-6, nossos resultados não evidenciaram diferenças estatísticas entre os grupos. Em contrapartida, os níveis de IL-17 e TNF- α no parênquima cerebral foi maior no grupo EAE tratado com salina quando comparado com os grupos controles (Secção “Resultados” do ANEXO A). As citocinas IL-17 e TNF- α estão altamente relacionadas a patogenicidade, severidade e progressão da EM (How Shing Koy et al., 2021) Corroborando com os nossos resultados, estudo recente realizado por Xiong e colaboradores (2018), também não observou diferenças estatísticas das concentrações cerebrais de IL-6 no 18° e 30° dpi da EAE, assemelhando-se ao nosso estudo cuja análise foi realizada no 21° dpi (Xiong, Wu, Qu, Xie, & Ren, 2018).

O ROR γ T consiste em um fator de transcrição nuclear altamente expresso em células Th17, que por sua vez, são uma das principais células imunológicas que medeiam a resposta autoimune associada à EM, resultando em inflamação crônica e degeneração no SNC. Em contradição com o que esperávamos, os animais do grupo EAE/salina, quando comparados com o grupo controle apresentaram uma redução da expressão na medula espinal e no pulmão de ROR γ T, enquanto que os animais EAE tratados com DMF em SLN mantiveram elevadas expressões de ROR γ T (Figura 3). No

entanto, estudo prévio demonstrou que nem todas as células que expressam ROR γ t são células Th17, sendo que mais da metade destas células, correspondem a uma subpopulação de células Foxp3+, atuando assim como células T reguladoras (Fujisawa, Nabekura, Kawachi, Otsuka, & Onodera, 2011). Outro estudo também observou que células Treg ROR γ t+ foram capazes de suprimir de forma mais eficaz a inflamação intestinal de modelos animais de colite quando comparados com células Treg ROR γ t- (Bhaumik, Mickael, Moran, Spell, & Basu, 2021).

Através dos resultados acima descritos associados aos expostos no “anexo A” deste trabalho, conclui-se que o DMF em nanopartículas sólidas lipídicas, quando administração por via inalatória, é capaz de atenuar o processo inflamatório neuro-imuno-pulmonar relacionados à EAE, podendo se tornar uma futura terapia para o tratamento da EM.

3. CAPITULO 3: EFEITOS NEUROIMUNOLÓGICOS DA ANGIOTENSINA-1-7 EM
LIPOSSOMAS NO TRATAMENTO POR NEBULIZAÇÃO DE ANIMAIS COM
ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

3.1 Introdução

Neste capítulo serão apresentados os dados referentes ao estudo que avaliou o papel neuroimunológicos da Ang-1-7 encapsulada por lipossomas através da administração inalatória em modelo animal de esclerose múltipla, conhecido como EAE.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos neuroimunológicos da Ang-1-7 em lipossomas no tratamento por nebulização de animais com EAE.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os atributos físico-químicos dos lipossomas;
- Avaliar a eficácia da via de administração inalatória para a entrega de fármacos nanoencapsulados ao SNC através da análise das condições clínicas dos animais tratados com Ang-1-7 em lipossomas;
- Avaliar os mecanismos imunomoduladores associados a administração da Ang-1-7 em lipossomas;
- Avaliar possível toxicidade pulmonar e sistêmica após a administração inalatória da Ang-1-7 em lipossomas.

3.3 Materiais E Métodos

3.3.1 Animais e delineamento experimental

Para os protocolos experimentais foram utilizados camundongos, fêmeas, da linhagem C57Bl/6, com idade de 12 semanas, procedentes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-UFMG). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG), protocolo nº 182/2017. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (30x20x13cm) sob condições ambientais padrão com ciclo claro-escuro de 12:12 horas, recebendo água e alimento *ad libitum* durante todo o período experimental. Após atingirem o peso de 20 gramas e 12 semanas de idade, os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos experimentais descritos no quadro 2.

3.3.2 Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados utilizando os seguintes lipídeos: diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietileno glicol 2000 (DSPE-PEG2000) ambos adquiridos pela Lipoid GmbH (Alemanha) e colesterol (CHO) adquirido pela Sigma-Aldrich Co. (Estados Unidos) na proporção molar de 10:5:1, respectivamente. O método de preparo dos lipossomas foi o de congelamento-descongelamento conforme previamente descrito (Kirby & Gregoriadis, 1984). Em suma, os lipídeos supracitados, foram solubilizados em clorofórmio em balão de fundo redondo que posteriormente foram levados ao evaporador rotativo com aquecimento a 60°C, sob vácuo, para evaporação do solvente e formação do filme lipídico. Após a retirada de todo solvente, o filme lipídico formado foi hidratado com água deionizada por 60 minutos a 60°C, sem vácuo. Após a hidratação do filme lipídico, os lipossomas passaram por um processo de congelamento-descongelamento (5 ciclos). Em seguida, as vesículas foram submetidas a um processo de calibração de tamanho por filtração repetida a 65°C, através de membrana de policarbonato com poro de 200 nm (5x) e 100 nm (5x), usando uma extrusora (Extruder 10-mL, Northern Lipid Inc, Canadá; GE Whatman). O volume de 1,0 mL da dispersão de lipossomas de tamanho calibrado foi hidratado com 1,0 mL de solução de Ang-1-7 (3 mg/L em NaCl 0,03 M), liofilizado

e armazenado a -20°C . As amostras liofilizadas foram então reidratadas em 0,2 mL de água deionizada e incubadas por 30 min, à 55°C com agitação a cada 10 min. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de PBS 0,01 M, e novamente a dispersão foi incubada por 30 min, à 55°C . Por fim, completou-se o volume até 1,4 mL com PBS 0,01 M e o mesmo foi submetido a uma nova calibração de tamanho em membrana de 100 nm (5x). A Ang-1-7 não encapsulada foi retirada da suspensão de lipossomas através de diálise em PBS 0,01 M, à 4°C , por 24 horas, com agitação constante.

3.3.3 Indução do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)

A EAE foi induzida utilizando a glicoproteína oligodendrocítica da mielina 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) como previamente descrito (Bernardes, et al., 2016; dos Santos et al., 2005; Bárbara F. Pinto et al., 2022). Inicialmente os animais foram pesados e tricotomizados na região da base da cauda, local da injeção da emulsão antigênica. Após tais procedimentos os animais foram mantidos para habituação no local de indução. Para indução, cada animal foi imunizado com duas injeções subcutâneas, com 50 μL cada, aplicadas próximas a base da cauda, sendo uma no dorso inferior esquerdo e outra no direito. A emulsão inoculada constitui de uma solução contendo 100 μg de peptídeo murinho MOG₃₅₋₅₅, (sequência MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) diluídos em 50 μL de salina 0,9% e 50 μL de Complexo adjuvante de Freund (CFA) suplementado com 4,0 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Para a emulsão alcançar uma viscosidade ideal, ambas soluções foram misturadas utilizando duas seringas de vidro acopladas a um *threeway* na sequência de 3 séries de 5 minutos de homogeneização, intercaladas por repouso de 3 minutos em gelo.

Além disso, foi administrada uma injeção intraperitoneal de toxina Pertussis (Sigma Chemical, EAU), 300ng/200 μl /animal em salina 0,9%, no momento da indução, e uma segunda dose após 48 horas. Os animais do grupo controle receberam um esquema similar de injeções contendo salina nos mesmos locais anatômicos com o objetivo de mimetizar o estresse sofrido pelos grupos EAE durante a indução do modelo experimental.

3.3.4 Tratamentos

Durante 20 dias, a cada 72 horas, incluindo o dia da indução da EAE (dia 0), os animais receberam os respectivos tratamentos por via inalatória. A administração foi realizada através do nebulizador (Soniclear/ Minisonic/ SP, Brasil), gentilmente doado pela empresa Soniclear. Em função do tratamento, diferentes soluções eram colocadas no nebulizador: ou solução salina 0,9% e Ang-1-7 (0,6µg/ml/animal), ou solução salina 0,9% e Ang-1-7 associada a lipossomas (1,8µg/ml/animal). Os grupos CTRL/salina e EAE/salina foram submetidos a inalação de 1,0 ml de solução salina 0,9%/animal. O grupo tratado com lipossomas vazios recebeu o mesmo volume de solução do grupo tratado com lipo/Ang-1-7. O tempo de nebulização para cada grupo foi de aproximadamente 15 minutos, sendo que o próprio aparelho informava quando a solução era totalmente nebulizada.

Quadro 2: Distribuição dos grupos experimentais

Grupos Experimentais
CTRL/salina: Administração inalatória de salina em animais saudáveis
CTRL/lipo: Administração inalatória de lipossomas em solução em animais saudáveis
CTRL/Ang-1-7: Administração inalatória de Ang-1-7 em solução em animais saudáveis
CTRL/lipo/Ang-1-7: Administração inalatória de lipossomas com Ang-1-7 em solução em animais saudáveis
EAE/salina: Administração inalatória de salina em animais EAE
EAE/lipo: Administração inalatória de lipossomas em solução em animais EAE

EAE/Ang-1-7: Administração inalatória de Ang-1-7 em solução em animais EAE

EAE/lipo/Ang-1-7: Administração inalatória de lipossomas com Ang-1-7 em solução em animais EAE

3.3.5 Avaliação da evolução clínica do EAE

No dia da indução e a cada 72 horas, ao longo de 20 dias, os animais foram pesados e avaliados quanto aos sinais clínicos característicos do modelo como previamente descrito (Bittner, Afzali, Wiendl, & Meuth, 2014). Este escore clínico se caracteriza-se por atribuição de pontos (0 a 10) de acordo com os seguintes fenótipos: 0) Sem sinais clínicos; 1) Paresia de cauda; 2) Paralisia de cauda; 3) Paresia de membros posteriores, movimento descoordenado; 4) Paralisia de uma pata posterior; 5) Paralisia de ambas patas posteriores; 6) Paralisia das patas posteriores e paresia das anteriores; 7) Paralisia das patas posteriores e uma pata anterior paralisada; 8) Paralisia de ambas as patas posteriores e anteriores; 9) Moribundo e 10) Morte.

3.3.6 Avaliação do comportamento motor e ansiedade

Utilizou-se o sistema automatizado (Actitrack v2.7.13.) para mensurar a atividade locomotora e exploratória dos animais dos grupos EAE/salina e EAE/lipo/Ang-1-7, assim como, para avaliar indiretamente a ansiedade dos animais. As avaliações motoras foram realizadas no dia anterior a indução da EAE e nos dias 4, 10 e 16 pós indução. Adicionalmente, o comportamento ansioso foi analisado no 4º dpi, momento em que os animais com EAE geralmente ainda não apresentam déficits motores que poderiam impactar na interpretação dos resultados. O aparato consiste em uma arena em acrílico que é acoplada a um sistema externo de infravermelho (25x25cm). Este sistema permite monitorar a distância total (cm) percorrida horizontalmente pelo animal, a locomoção, a atividade global, a velocidade média e máxima (cm/s) atingida pelos animais, o tempo de exploração nas divisões feitas na arena (centro e periferia) e sua exploração vertical. O animal permaneceu na arena

por 5 minutos em livre exploração. A caixa foi previamente higienizada com álcool 70% antes que um novo teste fosse iniciado (Branchi, Alleva, & Costa, 2002).

3.3.7 Avaliação da permeabilidade vascular

Para a avaliação da permeabilidade vascular, utilizou-se o corante Azul de Evans que, devido a sua capacidade de se ligar irreversivelmente à albumina plasmática, permite mensurar o extravasamento plasmático conforme descrito previamente (Lacerda-Queiroz, et al., 2011; Matos, et al., 2022; Saria & Lundberg, 1983). Primeiramente, no 20º dia pós indução, os animais foram anestesiados via i.p. com uma mistura de ketamina (60 mg/kg, Laboratório Cristália, SP), e xilazina (10 mg/kg, *Rompun®*, Bayer). Em seguida, administrou-se 200 µL de Azul de Evans 2% no plexo retro-orbital, e ao final de uma hora, os animais foram sacrificados, sendo realizada a perfusão transcardíaca. Os cérebros, medulas espinhais, pulmões e baços foram retirados e colocados em placa de Petri aberta para secagem por 48 horas em estufa a 40º C. A seguir, as amostras foram pesadas e foi acrescentado ao tecido 1,0 mL de formamida, para extração do corante, permanecendo 48 horas em temperatura ambiente. O corante extraído do tecido foi quantificado por espectrofotometria em leitor de ELISA, utilizando-se o comprimento de onda de 620 nm (Molecular Devices, USA). A concentração de Azul de Evans foi determinada a partir da curva-padrão com as seguintes concentrações 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625 e 0.3125 pg/mL.

3.3.8 Microscopia intravital na microvasculadura medular

A microscopia intravital foi realizada nos animais no 20º dpi da EAE, através da exposição da microcirculação da medula espinal mediante laminectomia como previamente descrito (Bernardes, et al., 2013). A cirurgia foi feita, a partir de assepsia e anestesia induzida por injeção i.p de uma mistura de ketamina (60 mg/kg, Laboratório Cristália, SP) e xilazina (10 mg/kg, *Rompun®*, Bayer). Em seguida, foi executada a laminectomia, com remoção das lâminas vertebrais da região torácica para a exposição dos vasos da medula. A técnica cirúrgica consiste na realização de cortes com profundidade crescente no músculo até atingir as vértebras que serão em

seguida seccionadas. Após obter o acesso, foram feitos cortes longitudinais, uma de cada lado da coluna, removendo em torno de 3 a 4 lâminas vertebrais (Figura 9).

Posteriormente, os animais foram submetidos administração 200 μ L de Rodamina 6G (0,3 mg/kg, SigmaPharm, SP) através do plexo retro-orbital. A rodamina 6 G é um fluorocromo que proporciona a marcação das mitocôndrias de leucócitos e plaquetas seletivamente. Após a exposição cirúrgica dos vasos superficiais da medula espinal o animal foi posicionado em uma plataforma de acrílico acoplada ao microscópio de fluorescência (Zeiss Imager M.2), e as janelas foram umedecidas constantemente com solução salina a 9%. A fluorescência associada à rodamina 6G foi visualizada por epi-iluminação (510-560 nm) e filtro de emissão de 590 nm.

Os eventos de rolamento e adesão leucocitários sobre o endotélio vascular foram avaliados ao longo do vaso (comprimento 100 μ m) durante 20 segundos ($n = 6-8$ vasos/animal), usando objetiva de 20X, tanto na vênula central da medula (localizada na linha mediana da porção dorsal da medula) quando nas vênulas pós-capilares, que drenam o sangue para o vaso central. Foram considerados aderidos os leucócitos que permanecerem no endotélio vascular por um período de 20 segundos, enquanto que o rolamento foi definido para os leucócitos que migraram da região central para a margem do vaso interagindo com o endotélio com velocidade menor que dos eritrócitos (Carvalho-Tavares et al., 2000).



Figura 9: Fotografias demonstrativas da técnica de microscopia intravital. A fluorescência foi visualizada pelo microscópio Zeiss Imager M.2, objetiva 20X (A).

Visualização da janela medular após cirurgia de laminectomia para observação pela microscopia intravital (B).

3.3.9 ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado para mensurar os níveis de citocinas em homogenatos de cérebro e medula espinal dos camundongos após o período experimental de 20 dias. Esta análise fornece importantes informações sobre a possível polarização das respostas imunes. O espectro de citocinas estudadas incluiu TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-6 (citocinas pró-inflamatórias) e IL-10 (citocina anti-inflamatória).

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (60mg/kg, Dopalen, Paulínea, Brasil) e Xilasina (10mg/kg, Anasedan, Paulínea, Brasil). Imediatamente após a sedação os cérebros e medulas espinais dos animais foram retirados e devidamente acondicionados em nitrogênio líquido até o final da coleta das amostras. As amostras dos tecidos foram pesadas e homogeneizadas em solução adequada para extração de citocinas, contendo inibidor de protease preparada a partir de uma solução de PBS 1x (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 μ l de aprotinina). Para cada 100 mg de tecido foi adicionado 1mL de solução para o processo de homogeneização. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado a -20°C até o uso. Os kits ELISA para dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-6 e IL-10 foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, USA).

O ensaio foi feito em placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, Illinois, USA), onde inicialmente foram adicionados 100 μ l/poço do anticorpo de captura, sendo a incubação mantida por 18 horas, a 4°C. Posteriormente o anticorpo de captura foi descartado e a placa foi lavada cinco vezes com PBS/Tween 0,1%. A etapa seguinte consistiu na adição de 200 μ l/poço de solução de bloqueio (PBS/BSA 1%), seguida de incubação por duas horas. Após o bloqueio houve nova etapa de lavagem das placas e 100 μ l de cada amostra e a curva padrão (em 7 diferentes concentrações) foram adicionados à placa. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C e posteriormente lavadas. Em seguida foram adicionados 100 μ l/poço de solução

de anticorpo de detecção, biotilado e específico para cada molécula, seguida de incubação de duas horas e uma etapa de lavagem. Transcorrida essa etapa, foram adicionadas a cada placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada, e foi adicionado o tampão substrato contendo Dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) e H₂O₂. Após cerca de 30 minutos, a reação foi interrompida com 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M.

A leitura das placas foi feita utilizando um leitor de placas a 492 nm (Thermo Plate reader). A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente. Sendo que a concentração mínima detectável para cada molécula avaliada foi: IL-1β: 15,62 pg/ml; IL-17: 10,9 pg/ml; IL-10: 31,25 pg/ml; IL-6: 31,25 pg/ml e TNF-α: 31,25 pg/ml.

3.3.10 Análise do lavado broncoalveolar

A colheita do lavado broncoalveolar (BAL) foi realizada para quantificar a presença de leucócitos no espaço alveolar. Assim, no 20º dpi, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de Ketamina (60 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e a traquéia de cada animal foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno de 1,7 mm de diâmetro. A lavagem foi feita a partir da injeção e coleta, por três vezes consecutivas, de alíquotas contendo 1 ml de PBS estéril, obtendo-se um volume final de lavagem equivalente a 1,7-2,0 ml. O líquido coletado foi centrifugado a 4°C, durante 5 min, a uma velocidade de 1500 rpm, formando um pellet de células, que por sua vez, foi utilizado para a contagem total e diferencial das células. O pellet de células foi ressuspendido em 100 µl de 3% de BSA diluído em PBS, e o número total de leucócitos foi determinado pela contagem das células coradas com a solução do Turk na câmara de Neubauer. A contagem total foi feita por microscopia óptica, utilizando uma objetiva de 40x. Para a contagem diferencial, as lâminas foram preparadas por citospin (Cytospin 3, Shandon) e coradas com May-Grunwald-Giemsa, como descrito anteriormente (Campa et al., 2018; Russo, et al., 2018). As contagens diferenciais, incluindo macrófagos e linfócitos, foram realizadas em microscópio óptico com uma objetiva de 100x utilizando óleo de imersão.

3.3.11 Avaliação da mecânica respiratória

Os animais foram anestesiados com uma injeção subcutânea de ketamina (130 mg/kg) e xilazina (8,5 mg/kg) com o intuito de manter a respiração espontânea sob anestesia. Os camundongos foram traqueostomizados, colocados em um pletismógrafo corporal e conectados a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, Carolina do Norte E.U.A.). Este espirômetro mensura, semi-automaticamente, três diferentes manobras: capacidade residual funcional (CRF) da Lei de Boyle, manobra de pressão-volume quase-estático e manobra de volume de fluxo rápido, conforme descrito anteriormente (Campa, et al., 2018; Tavares et al., 2016). Sob respiração mecânica a resistência pulmonar (RP) foi determinada pelo teste de resistência. Para medir a CRF, a ventilação foi interrompida no final da expiração com fechamento imediato da válvula proximal do tubo endotraqueal. Manobras de respiração espontânea contra uma válvula fechada com consequentes mudanças de pressão foram então registradas para calcular o CRF pela lei de Boyle. Para medir a Capacidade Inspiratória (CI), foi realizada a manobra de pressão-volume quase-estática, na qual o pulmão é inflado a um padrão pressão de +30 cm H₂O e depois exalado lentamente até atingir a pressão negativa de -30 cm H₂O. Manobras subótimas foram rejeitadas, e para cada teste, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas em cada animal para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos.

3.3.12 Avaliação das alterações histopatológicas

No 20º dpi do modelo de EAE, os animais anestesiados com uma mistura de Ketamina (60mg/kg, Dopalen, Paulínea, Brasil) e Xilasina (10mg/kg, Anasedan, Paulínea, Brasil) foram submetidos ao procedimento de perfusão transcardíaca com 10 mL de salina, seguida de perfusão com 10 mL de formol tamponado a 4 %, pH 7,2. Os baços e corações foram coletadas e rapidamente fixadas em formol tamponado. As amostras foram processadas rotineiramente, incluídas em parafina, e submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos com 4 µm de espessura.

1.1.5.12 Hematoxilina e Eosina (H&E)

Para avaliação *in situ* do infiltrado inflamatório, os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. Após desparafinização em dois banhos de xilol, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%) e então lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela Hematoxilina, por 10 minutos e lavados em água corrente, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado (100 mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e novamente lavados em água corrente para evitar acidificação excessiva. Posteriormente, foram corados pela Eosina, por 30 segundos. Após a última lavagem em água corrente, foram desidratados, em 2 banhos de álcool absoluto e levados à estufa a 56°C para secagem e posterior montagem com lamínula e Entellan.

1.1.5.13 Quantificação das imagens

Para avaliação do infiltrado inflamatório, todos os núcleos celulares presentes foram quantificados em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1,5 \times 106 \mu\text{m}^2$) para a quantificação. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio óptico Leica DM5000B. Todas as imagens foram analisadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3, com a colaboração da Professora Cláudia Carneiro, do Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.3.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 8.0 (San Diego, CA) e apresentados com média \pm SEM. Para todas as variáveis foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Em se tratando do peso corporal e o escore clínico, utilizou-se o teste Two-away ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Nas análises dos dados relacionados ao comportamento motor e ansiedade, permeabilidade vascular do cérebro, pulmão, medula e baço, assim como nas análises referentes aos resultados do ELISA, infiltrado inflamatório e mecânica

pulmonar foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, conforme especificado nas legendas dos gráficos.

Para avaliação dos dados relacionados ao rolamento e adesão leucocitária na medula espinal foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Com relação aos dados referentes as análises histológicas, utilizou-se o teste One-way ANOVA, seguido pelo-pós teste de Tukey.

Para avaliar se houve diferença significativa entre os grupos, foi considerado o nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

3.4 Resultados

3.4.1 Atributos físico-químicos dos lipossomas

Os lipossomas utilizados neste experimento foram previamente caracterizados físico-quimicamente. Os lipossomas sem os peptídeos (lipossomas vazios) apresentaram um diâmetro de 122,4 nm e um Índice de Polidispersão (PDI) equivalente a 0,029. Por outra parte, os lipossomas contendo Ang-1-7, após liofilização e nova extrusão, obtiveram um diâmetro de 132,8 nm, com um PDI de 0,022. Conforme os resultados de caracterização, podemos verificar que o diâmetro médio foi em torno de 133,0 nm e que a população de lipossomas apresentou-se monodispersa evidenciado pelo PDI menor que 0,3 (Tabela 1).

Tabela 1: Atributos físico-químicos dos lipossomas

Nanoestruturas	Diâmetro (nm)	PDI	Meio de diluição
Lipo	122,4	0,029	PBS
Lipo/Ang-1-7	132,8	0,022	PBS

Ang-1-7: Angiotensina 1-7; Lipo: lipossomas; PDI: Índice de polidispersão; nm: nanômetro

3.4.2 Avaliação clínica

Os sinais clínicos, peso corporal, comportamento motor e ansiedade foram avaliados a fim de determinar a eficácia terapêutica da inalação de Ang-1-7 encapsulada em lipossomas em animais com EAE. Assim, a cada 72 horas a partir do dia da indução da EAE, os camundongos foram submetidos às análises do peso e escore clínico. Além disso, no dia anterior a indução e no 4^o, 10^o e 16^o dpi os mesmos foram avaliados quanto ao comportamento motor. Adicionalmente, o comportamento ansioso foi analisado no 4^o dpi..

O início dos sinais clínicos característicos do modelo EAE ocorreu no 6^o dpi, apresentando um acentuado aumento a partir do 12^o dia. Também no 12^o dia, considerando os grupos EAE (doentes), apenas o grupo EAE/lipo/Ang-1-7 não apresentou diferenças significativas com os grupos controles, demonstrando um

retardo no aparecimento dos sinais clínicos. Em contrapartida, a partir do 15º dpi, todos os grupos EAE (doentes) apresentaram diferença estatística com os grupos controles. Por outro lado, os animais submetidos a administração inalatória de Ang-1-7 encapsuladas em lipossomas apresentaram um menor escore clínico quando comparado com os demais grupos EAE. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos dias 15, 18 e 20 pós-indução para o grupo EAE/lipo/Ang-1-7 quando comparado com os grupos EAE/salina ($p < 0.05$, $p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, respectivamente), EAE/lipo ($p < 0.001$, $p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, respectivamente) e EAE/Ang-1-7 ($p < 0.0001$, $p < 0.001$ e $p < 0.001$, respectivamente) (Figura 10A). Ao longo do período experimental, os grupos controles não apresentaram diferença estatísticas entre si, ao mesmo tempo que o grupos EAE/salina, EAE/lipo e EAE/Ang-1-7 também não foram estatisticamente diferentes.

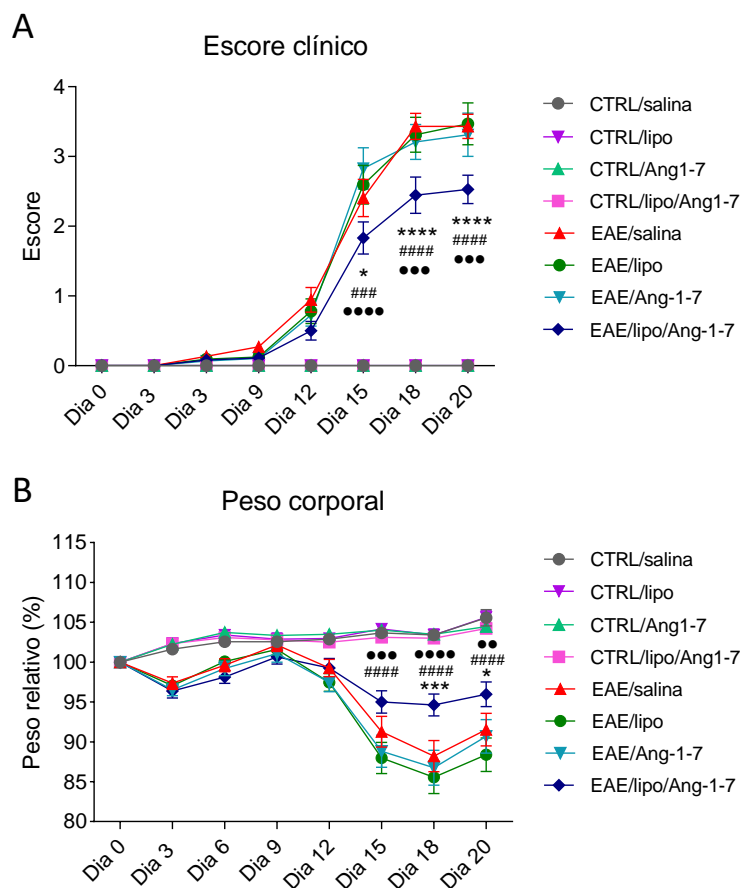


Figura 10: Análise da evolução clínica dos animais. Avaliação do escore clínico (A) e do peso corporal (B) a cada 72 horas ao longo de 20 dias. Dados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$. Foi utilizado o teste Two-away ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. $n = 29-37$ animais/grupo. * diferença significativa entre os grupos EAE/lipo/Ang-1-7 e EAE/salina; # diferença

significativa entre os grupos EAE/lipo/Ang-1-7 e EAE/lipo; • diferença significativa entre os grupos EAE/lipo/Ang-1-7 e EAE/Ang-1-7.

Com relação ao peso corporal, nossos resultados demonstraram que os animais EAE tratados com Ang-1-7 associada a lipossomas possuíram uma menor perda de peso quando comparado com o grupo EAE/salina no 18º e 20º dias ($p < 0.001$, $p < 0.05$, respectivamente), e com os grupos EAE/lipo ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, respectivamente), e EAE/Ang-1-7 nos dias 15º, 18º e 20º dias ($p < 0.001$, $p < 0.0001$ e $p < 0.01$, respectivamente). Não houve diferença estatística significativa entre os demais grupos doentes, assim como entre os grupos controles (Figura 10B).

Com o objetivo de verificar os efeitos da nebulização da Ang-1-7 encapsulada em lipossomas sobre o comportamento motor, animais dos grupos CTRL/salina, EAE/salina e EAE/lipo/Ang-1-7 foram avaliados quanto a distância total percorrida, locomoção, atividade global, velocidade média e velocidade máxima alcançada por meio do sistema automatizado Actitrack v2.7.13 no dia anterior a indução da EAE e nos dias 4, 10 e 16 pós indução. Nossos resultados evidenciaram que os animais EAE sem tratamento apresentaram uma redução da distância total percorrida e da atividade global nos dias 10 e 16 pós indução da doença quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$) e que a administração de Ang-1-7 em lipossomas foi capaz de atenuar essas alterações ($p < 0.01$ no 10º dia e $p < 0.05$ no 16º dia) (Figura 11A, B, C e D).

O grupo EAE/salina também obteve menores valores de velocidade média ($p < 0.05$) e máxima ($p < 0.01$) no 10º dia do período experimental e, mais uma vez, a Ang-1-7 encapsulada aumentou significativamente esses valores ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ respectivamente). No 16º dia, podemos observar uma redução da velocidade máxima no grupo EAE/salina ($p < 0.05$), no entanto, apesar de apresentar um ligeiro aumento, o grupo EAE/lipo/Ang-1-7 não apresentou diferenças estatísticas significativas. Porém, este último grupo, EAE/lipo/Ang-1-7, neste mesmo dia, em se tratando da velocidade média, obteve um aumento dessa variável quando comparado aos animais EAE/salina ($p < 0.05$) (Figura 11E, F, G e H).

No que diz respeito a locomoção, no 10º dia pós indução, a Ang-1-7 em lipossomas aumentou consideravelmente esta variável ao ser comparada ao grupo EAE/salina ($p < 0.01$) que, por sua vez, apresentou as menores taxas de locomoção

($p < 0.05$ comparado ao grupo controle). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais no 16º dia (Figura 11I e J).

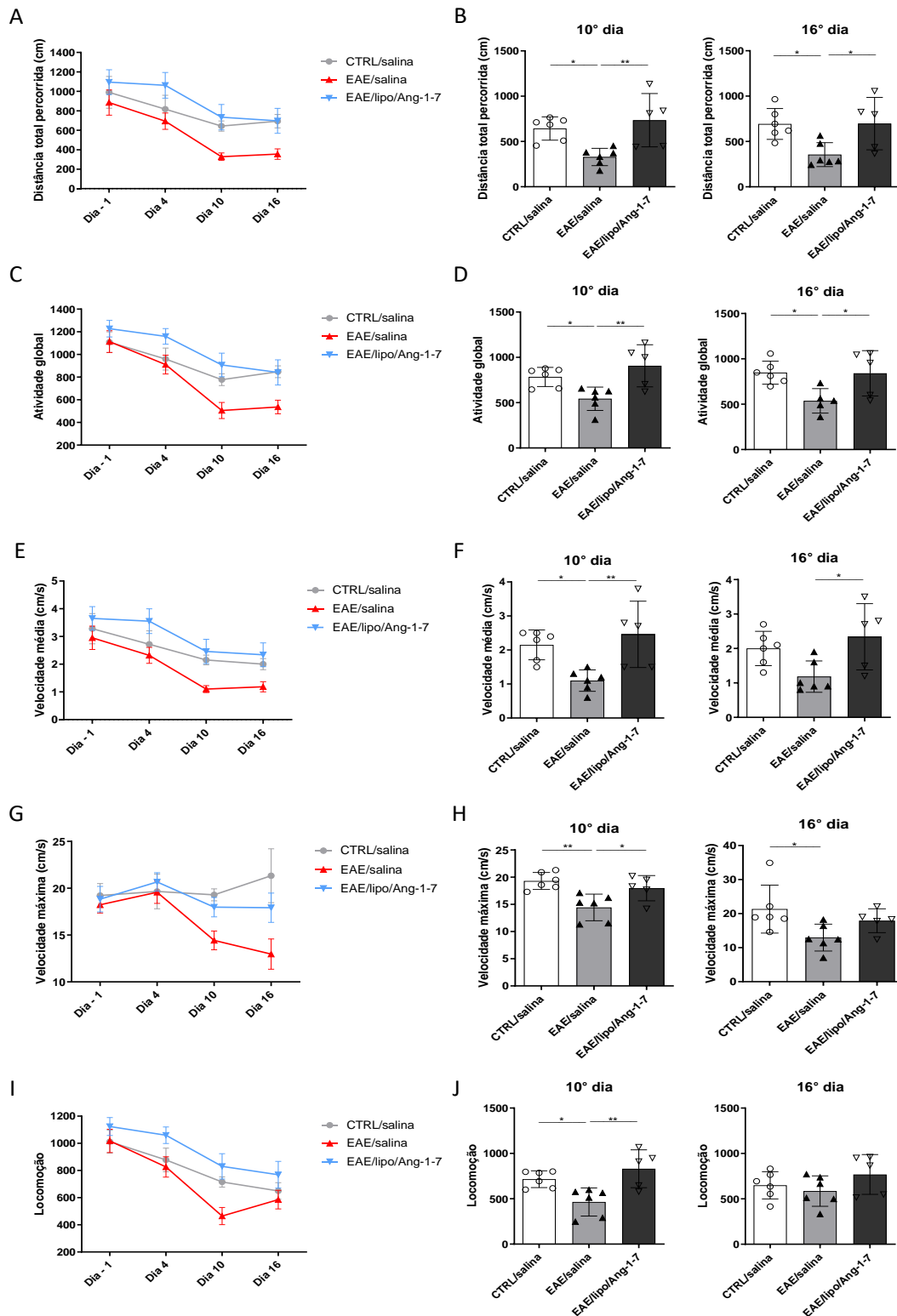


Figura 11: Análise do comportamento motor. Avaliação da distância total percorrida (A e B), atividade global (C e D), velocidade média (E e F), velocidade máxima (G e H) e locomoção (I e J) no dia anterior a indução da EAE e nos dias 4, 10 e 16 pós

indução, dos animais pertencentes aos grupos CTRL/salina, EAE/salina e EAE/lipo/Ang-1-7. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

No 4º dia pós indução da EAE, momento em que os animais ainda não apresentavam distúrbios motores, os animais também foram avaliados quanto ao comportamento ansioso através do teste de campo aberto. Dessa forma, o tempo de permanência na zona central e periférica, assim como, o número de entradas na zona central, foram contabilizados. Este teste comportamental já está bem caracterizado na literatura, sendo que o aumento do tempo de permanência na zona central e do número de entradas nessa mesma zona é um indicativo de menor comportamento ansioso (Ayatollahi et al., 2017).

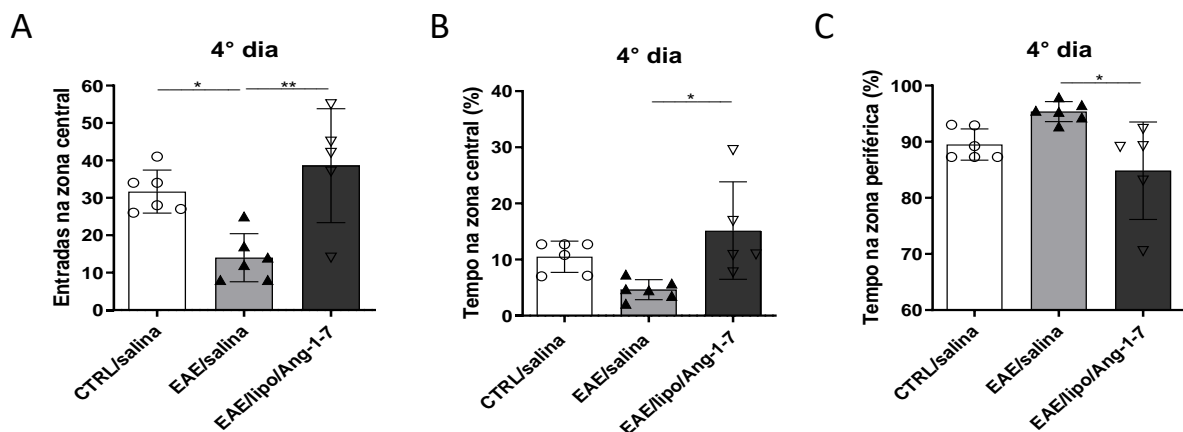


Figura 12: Análise do comportamento ansioso. Avaliação número de entradas na zona central (A), do tempo de permanência na zona central (B) e do tempo de permanência na zona periférica (C) no 4º dia pós indução da EAE dos animais pertencentes aos grupos CTRL/salina, EAE/salina e EAE/lipo/Ang-1-7. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

Os resultados demonstraram que os animais EAE sem tratamento apresentaram uma diminuição do número de entradas na zona central quando comparados ao grupo CTRL/salina ($p < 0.05$). Por sua vez, a administração inalatória de Ang-1-7 encapsulada por lipossomas foi capaz de reverter essa alteração ($p < 0.01$) (Figura 12A).

Em se tratando do tempo de permanência em ambas as zonas, apesar de observarmos uma ligeira redução do tempo de permanência na zona central e, conseqüentemente, um aumento do tempo na zona periférica, o grupo EAE/salina não apresentou diferenças estatísticas com o grupo CTRL/salina. Em contrapartida, os animais pertencentes ao grupo EAE/lipo/Ang-1-7 apresentaram aumento do tempo de permanência na zona central e redução do tempo na zona periférica quando comparadas com o grupo EAE/salina ($p < 0.05$) (Figura 12B e C).

3.4.3 Avaliação dos mecanismos imunoregulatórios no SNC

Com o intuito de avaliar os efeitos da inalação de Ang-1-7 em lipossomas no SNC, a permeabilidade vascular do cérebro e medula espinal, os níveis cerebrais e medulares de citocinas pró e anti-inflamatórias, assim como as interações leucócito-endotélio *in vivo* na microvasculatura medular foram analisados.

A análise da permeabilidade vascular, através da quantificação do extravasamento de líquido vascular corado com Azul de Evans para o interstício tecidual é uma medida indireta da ocorrência do processo inflamatório. Com relação a permeabilidade vascular cerebral, observamos que os animais do grupo EAE/salina apresentaram um aumento da permeabilidade vascular quando comparado com os grupos CTRL/salina ($p < 0,01$), CTRL/lipo ($p < 0,01$), CTRL/Ang-1-7 ($p < 0,001$) e CTRL/lipo/Ang-1-7 ($p < 0,001$). Em contrapartida, a administração inalatória de Ang-1-7 encapsulada em lipossomas foi capaz de reverter este aumento da permeabilidade cerebral quando comparada com os animais pertencentes ao grupo EAE/salina ($p < 0,01$) (Figura 13A).

Em se tratando da permeabilidade vascular da medula espinal, pode-se evidenciar que o grupo EAE/salina apenas apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo CTRL/salina ($p < 0,05$). Por sua vez, o grupo EAE tratado com lipossomas vazios foi significativamente diferente dos grupos CTRL/salina ($p < 0,01$), CTRL/lipo ($p < 0,01$), CTRL/Ang-1-7 ($p < 0,01$) e CTRL/lipo/Ang-1-7 ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os demais grupos experimentais (Figura 13B).

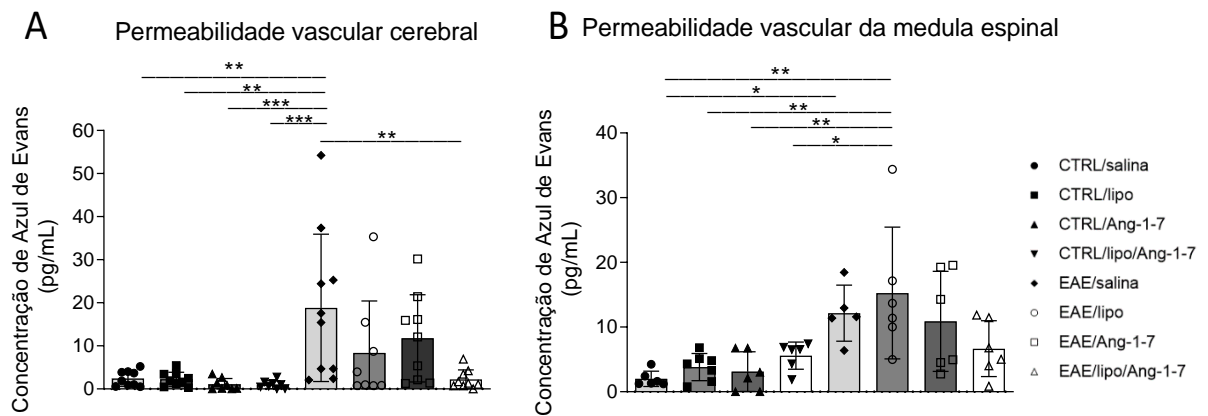


Figura 13: Análise da permeabilidade vascular do cérebro e medula espinal através da quantificação por espectrometria da concentração de azul de Evans extravasado para o parênquima tecidual. Permeabilidade vascular cerebral (A) e da medula espinal (B) dos grupos CTRL/salina, CTRL/lipo, CTRL/Ang-1-7, CTRL/lipo/Ang-1-7, EAE/salina, EAE/lipo, EAE/Ang-1-7 e EAE/lipo/Ang-1-7 no 20º dia pós indução da EAE. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Com o objetivo de quantificar as citocinas pró e anti-inflamatórias no cérebro e medula espinal foi realizado a técnica de ELISA no 20º dia pós indução da EAE. Em se tratando da concentração da citocina TNF- α , foi observado um aumento dos níveis medulares no grupo EAE/salina quando comparado com o grupo CTRL/salina ($p < 0,05$), sendo revertido com a administração inalatória de Ang-1-7 em lipossomas ($p < 0,05$) (Figura 14F). Não foi observado diferenças estatísticas entre os grupos no parênquima cerebral (Figura 14A).

Adicionalmente, nossos resultados revelaram que os animais pertencentes aos grupos EAE/salina e EAE/lipo apresentaram aumento das concentrações cerebrais de IL-6 quando comparados com os grupos CTRL/salina ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente), CTRL/lipo ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente) e CTRL/lipo/Ang-1-7 ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Em contrapartida, os animais EAE que receberam Ang-1-7 encapsulada em lipossomas obtiveram uma redução significativa da concentração cerebral de IL-6 ao serem comparados com os grupos EAE/salina ($p < 0,0001$) e EAE/lipo ($p < 0,001$) (Figura 12B). No parênquima medular foi possível observar um aumento de IL-6 nos grupos EAE/salina e EAE/lipo quando comparado com o grupo CTRL/salina ($p < 0,05$) (Figura 12G).

Com relação a IL-17, os animais do grupo EAE/salina e EAE/lipo obtiveram um aumento das concentrações cerebrais ao serem comparados com o grupo CTRL/salina ($p < 0,05$) (Figura 12C). Não houve diferença estatística da concentração desta mesma citocina ao avaliar o parênquima medular (Figura 12H).

Nas análises referentes a interleucina IL-1 β , não foi evidenciado diferença estatística significativa entres os grupos experimentais tanto no cérebro, quando na medula espinal (Figura 12D e I).

Com relação a interleucina anti-inflamatória IL-10, os resultados obtidos demonstraram que os animais do grupo EAE/salina apresentaram redução de sua concentração cerebral quando comparados com os grupos CTRL/salina ($p < 0,01$), CTRL/lipo ($p < 0,05$) e CTRL/lipo/Ang-1-7 ($p < 0,0001$). Por sua vez, a administração inalatória de Ang-1-7 em lipossomas reverteu esta redução ($p < 0,01$) (Figura 12E). No parênquima medular a Ang-1-7 encapsulada também foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 quando comparados com os demais grupos EAE/salina ($p < 0,05$) e EAE/lipo ($p < 0,01$) (Figura 12J).

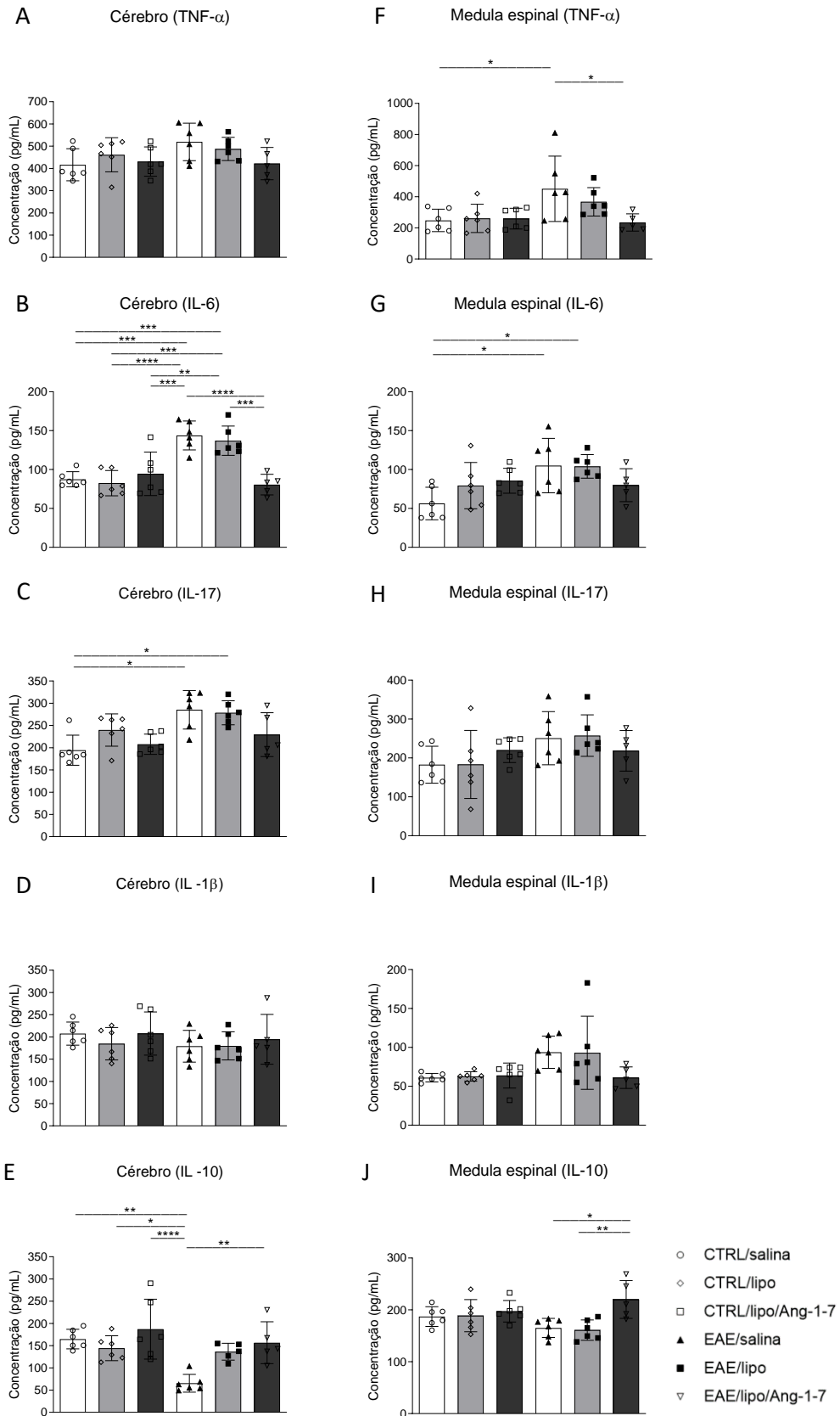


Figura 14: Análise da concentração das citocinas inflamatórias no cérebro e medula espinal através do ELISA. Avaliação das concentrações cerebrais das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B), IL-17 (C), IL-1B (D) e IL-10 (E). Avaliação das concentrações medulares

das citocinas TNF- α (F), IL-6 (G), IL-17 (H), IL-1B (I) e IL-10 (J) dos grupos CTRL/salina, CTRL/lipo, CTRL/Ang-1-7, CTRL/lipo/Ang-1-7, EAE/salina, EAE/lipo, EAE/Ang-1-7 e EAE/lipo/Ang-1-7 no 20º dia pós indução da EAE. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-away ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

Para avaliação das interações leucócito-endotélio *in vivo* na microvasculatura medular, no 20º dpi, os animais dos grupos controles e EAE foram submetidos a cirurgia de laminectomia para retirada das vértebras torácicas. A seguir foi feita a injeção intra-plexo orbital do fluorocromo Rodamina 6G, com o objetivo de visualizar os leucócitos fluorescentes e acompanhar de forma dinâmica as etapas de rolamento e adesão leucocitária *in vivo* através da técnica de microscopia intravital. Ao visualizar a microcirculação da medula, foram quantificados o número de leucócitos rolando e aderidos tanto na vênula central quanto nas vênulas pós-capilares que drenam o sangue para o vaso central. As quantificações do recrutamento *in vivo* foram feitas ao longo do comprimento do vaso (100 μm), e em vasos cujos diâmetros variavam de 20 a 60 μm .

As evidências coletadas mostraram que todos os animais EAE apresentaram um aumento significativo do rolamento e adesão leucocitária, tanto das vênulas pós-capilares quanto dos vasos centrais, quando comparados com os demais grupos controle ($p < 0.0001$) (Figura 15A, B, C e D). No entanto, de forma inesperada, evidenciamos que animais EAE submetidos a administração inalatória de Ang-1-7 encapsulada por lipossomas exibiram aumento mais acentuado do rolamento ($p < 0.0001$) e da adesão de leucócitos ($p < 0.05$) nas vênulas centrais ao compará-los ao grupo EAE/salina (Figura 15A e B). As microfotografias demonstrando o recrutamento leucocitário dos grupos CTRL/salina, EAE/salina e EAE/lipo/Ang-1-7 estão representadas na figura 13E.

EAE/Ang-1-7 e EAE/lipo/Ang-1-7 no 20° dia pós indução da EAE. Imagens representativas do recrutamento leucocitário visualizado por microscopia intravital (D). Os pontos fluorescentes indicam os leucócitos. Objetiva de 20X. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

3.4.4 Avaliação da toxicidade pulmonar

Para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos advindos da via de administração por nebulização, primeiramente, a permeabilidade vascular e os níveis de citocinas inflamatórias pulmonares foram avaliados no 20° dpi da EAE. Nossos resultados revelaram pela primeira vez que os animais EAE sem tratamento apresentaram aumento da permeabilidade vascular pulmonar e que a administração de Ang-1-7 encapsulada em lipossomas foi capaz de reduzir tal efeito ($p < 0,001$). Entretanto, os animais pertencentes ao grupo EAE/lipo apresentaram a mesma resposta pulmonar do grupo alvo do nosso estudo ($p < 0,001$). Os animais EAE submetidos a administração inalatória apenas de Ang-1-7 puras apresentaram diferença estatística tanto quando comparados aos grupos EAE/salina ($p < 0,05$) e EAE/lipo ($p < 0,01$), quanto quando comparados com o grupo EAE/lipo/Ang-1-7 ($p < 0,01$). Por sua vez, o grupo EAE/salina também foi diferente dos grupos CTRL/salina ($p < 0,01$), CTRL/lipo ($p < 0,001$), CTRL/Ang-1-7 ($p < 0,001$) e CTRL/lipo/Ang-1-7 ($p < 0,05$) (Figura 16A).

Em se tratando da concentração pulmonar da citocina inflamatória TNF- α , nossos resultados evidenciaram que os todos os animais doentes apresentaram um aumento significativo dos níveis pulmonares quando comparados aos controles ($p < 0,0001$). De forma surpreendente, observou-se que animais EAE nebulizados com Ang-1-7 encapsulada por lipossomas apresentaram uma redução significativa de TNF- α ao serem comparados aos grupos EAE/salina ($p < 0,001$) e EAE/lipo ($p < 0,05$) (Figura 16B). Também evidenciou-se um aumento pulmonar de IL-17 nos grupos EAE/salina e EAE/lipo quando comparados com os grupos CTRL/salina ($p < 0,05$ apenas em se tratando do grupo EAE/salina), CTRL/lipo ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) e CTRL/lipo/Ang-1-7 ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Por sua vez, não houve diferenças estatísticas entre os grupos controle e o grupo

EAE/lipo/Ang-1-7, nem entre este último com os demais grupos controles (Figura 16C).

Com relação a IL-6, apenas foram encontradas diferenças significativas entre todos os grupos EAE com os grupos CTRL/lipo e CTRL/lipo/Ang-1-7 ($p < 0,05$) (Figura 16D). Por sua vez, não foi observado diferenças entre os grupos experimentais ao analisar as concentrações pulmonares de IL-10 (Figura 16E).

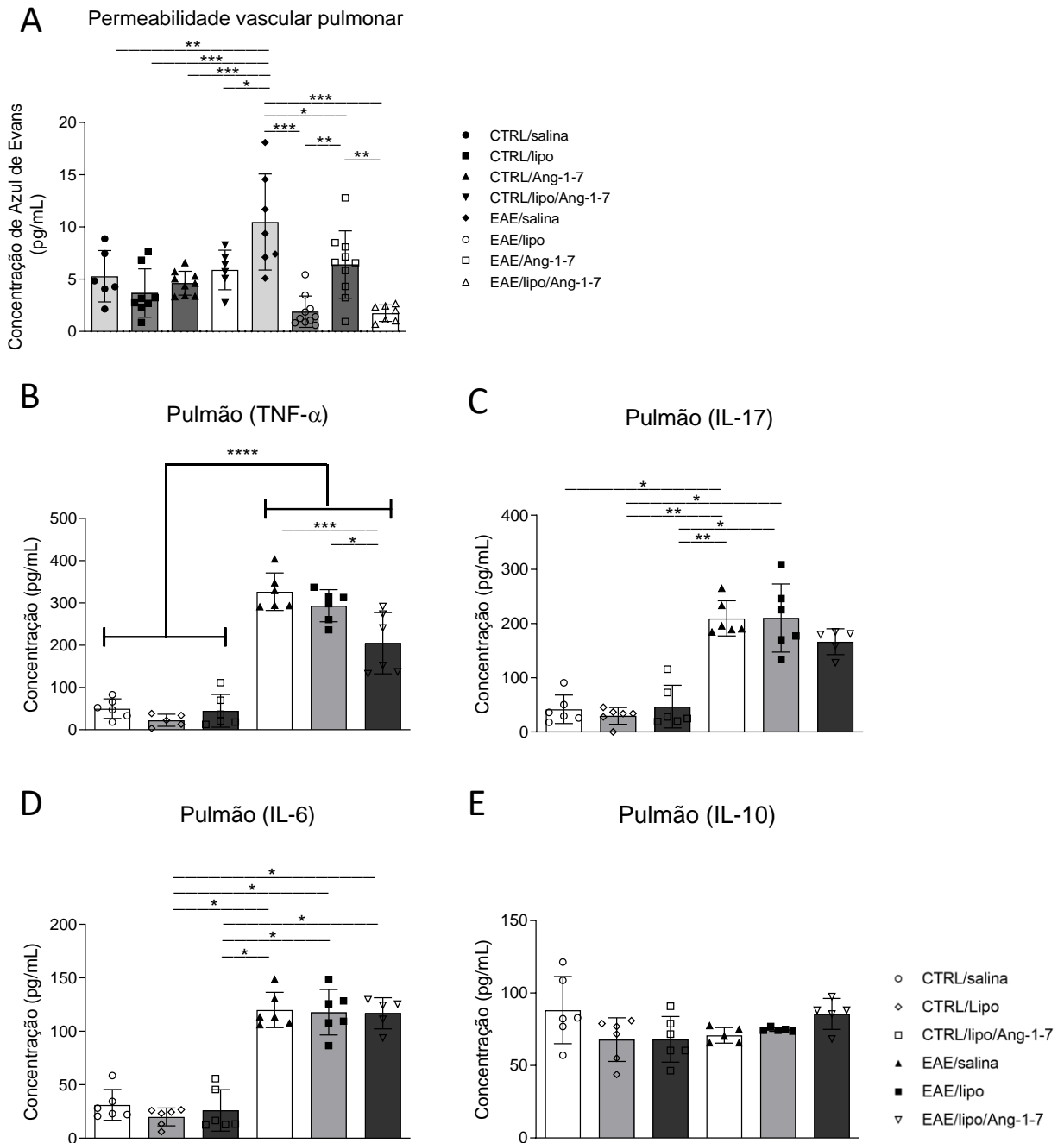


Figura 16: Análise da toxicidade pulmonar. Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar (A) e das concentrações pulmonares de TNF- α (B), IL-17 (C), IL-6 (D) e IL-10 (E) dos grupos CTRL/salina, CTRL/lipo, CTRL/Ang-1-7, CTRL/lipo/Ang-1-7,

EAE/salina, EAE/lipo, EAE/Ang-1-7 e EAE/lipo/Ang-1-7 no 20º dia pós indução da EAE. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-away ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e $p < 0.0001$.

A partir da evidência inédita que a inalação de Ang-1-7 em lipossomas foi capaz de atenuar uma possível resposta inflamatória pulmonar evidenciada nos animais EAE, nosso próximo passo foi quantificar as populações de células inflamatórias, nomeadamente dos linfócitos, macrófagos e leucócitos totais a nível pulmonar, através da contagem celular na câmara de Neubauer. Mais uma vez, nossos resultados demonstraram que os animais EAE/salina apresentaram um significativo aumento de linfócitos e leucócitos totais ($p < 0.05$) sendo que a Ang-1-7 em lipossomas via inalação reverteu este aumento ($p < 0.05$) (Figura 17A e C). Não foi observado diferença estatística na quantidade de macrófagos pulmonares entre os grupos experimentais (Figura 17B).

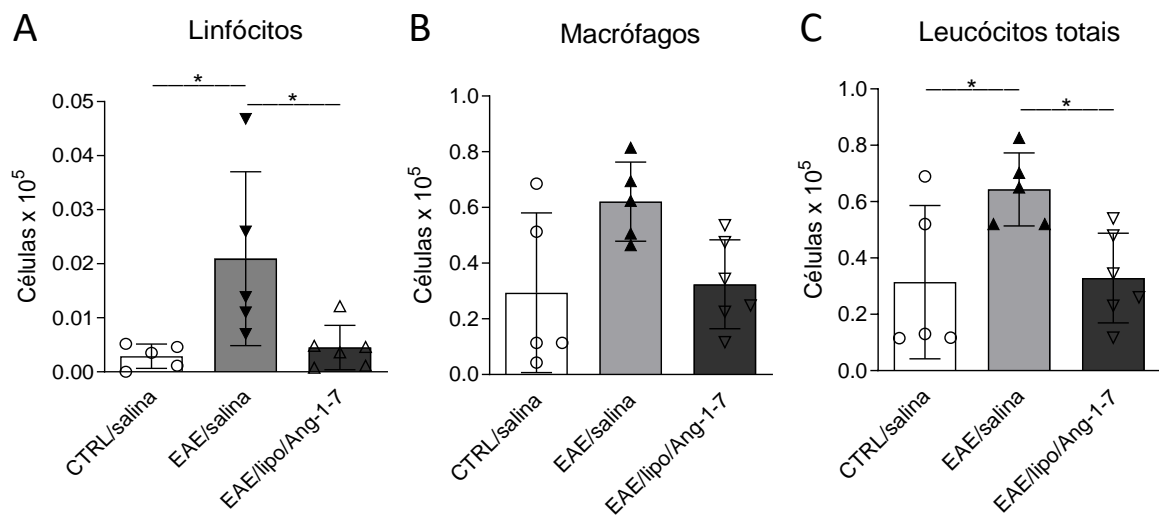


Figura 17: Análise do infiltrado inflamatório pulmonar. Quantificação de linfócitos (A), macrófagos (B) e leucócitos totais (C) dos grupos CTRL/salina, EAE/salina, e EAE/lipo/Ang-1-7 no 20º dia pós indução da EAE. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-away ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e $p < 0.0001$.

Com o objetivo de compreender se a aumento da resposta inflamatória pulmonar observada nos animais EAE poderia influenciar a fisiologia pulmonar, avaliamos a mecânica respiratória dos animais por meio da pletismografia. Foi

observado que os camundongos EAE sem tratamento apresentaram uma piora da função pulmonar através da redução da capacidade respiratória ($p < 0.05$), da capacidade residual funcional ($p < 0.01$), e do aumento da resistência pulmonar ($p < 0.01$) (Figura 18A, B e C). Interessantemente, a administração inalatória de Ang-1-7 em lipossomas foi capaz de atenuar a disfunção pulmonar, proporcionando um aumento da CRF ($p < 0.01$) e redução da RP ($p < 0.01$) (Figura 18B e C). Apesar de apresentar um ligeiro aumento, não houve diferenças estatísticas na capacidade inspiratória entre os grupos EAE/salina e EAE/lipo/Ang-1-7 (Figura 18A).

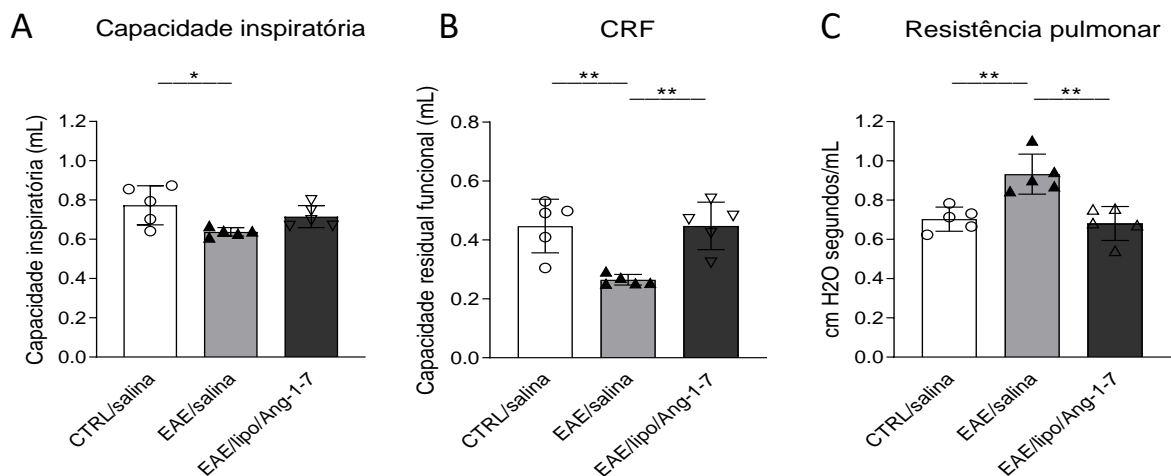


Figura 18: Análise da mecânica pulmonar. Avaliação da capacidade inspiratória (A), capacidade residual funcional (B) e resistência pulmonar (C) dos animais pertencentes aos grupos CTRL/salina, EAE/salina, e EAE/lipo/Ang-1-7 no 20º dia pós indução da EAE. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e $p < 0.0001$.

3.4.5 Avaliação da toxicidade sistêmica

A avaliação da toxicidade sistêmica foi realizada no 20º dia pós indução com o intuito de averiguar se a administração inalatória juntamente com os lipossomas e o peptídeo em questão estariam associados a algum efeito adverso sistêmico. Para isso, inicialmente foi quantificada a permeabilidade vascular do baço, importante órgão linfóide responsável pela hematopoiese e hemocaterese, além de participar no reconhecimento imunológico de agentes patogênicos (Wei et al., 2022). Atualmente, o baço tem se tornado um alvo de estudos farmacocinéticos principalmente em se

tratando das novas gerações de fármacos, incluindo os lipossomas, com possíveis implicações relevantes a sua eficácia e toxicidade (Cataldi, Vigliotti, Mosca, Cammarota, & Capone, 2017). Com relação a permeabilidade vascular esplênica não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Figura 19). Confirmando esses resultados, a análise histológica não evidenciou infiltrado inflamatório em nenhum grupo experimental. Entretanto, foi possível observar que todos os grupos EAE apresentaram hiperplasia da polpa vermelha com desorganização da polpa branca (Figura 20), além de um aumento do tamanho do baço (dados não apresentados).

Permeabilidade vascular do baço

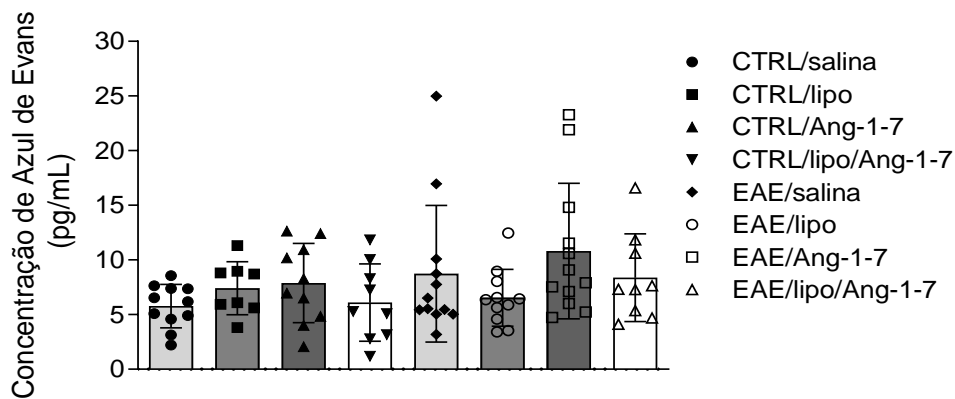


Figura 19: Análise da permeabilidade vascular do baço. Avaliação da permeabilidade vascular do baço dos grupos CTRL/salina, CTRL/lipo, CTRL/Ang-1-7, CTRL/lipo/Ang-1-7, EAE/salina, EAE/lipo, EAE/Ang-1-7 e EAE/lipo/Ang-1-7 no 20º dia pós indução da EAE. Dados apresentados como média \pm SD. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e $p < 0.0001$.

O próximo passo foi avaliar os potenciais efeitos histopatológicos do protocolo terapêutico sobre tecido cardíaco. Não foi possível evidenciar nenhuma toxicidade cardíaca a respeito de infiltrado inflamatório, desorganização tecidual e morte celular (Figura 21), demonstrando que a terapia em estudo, possivelmente, não causou efeitos colaterais a nível cardíaco.

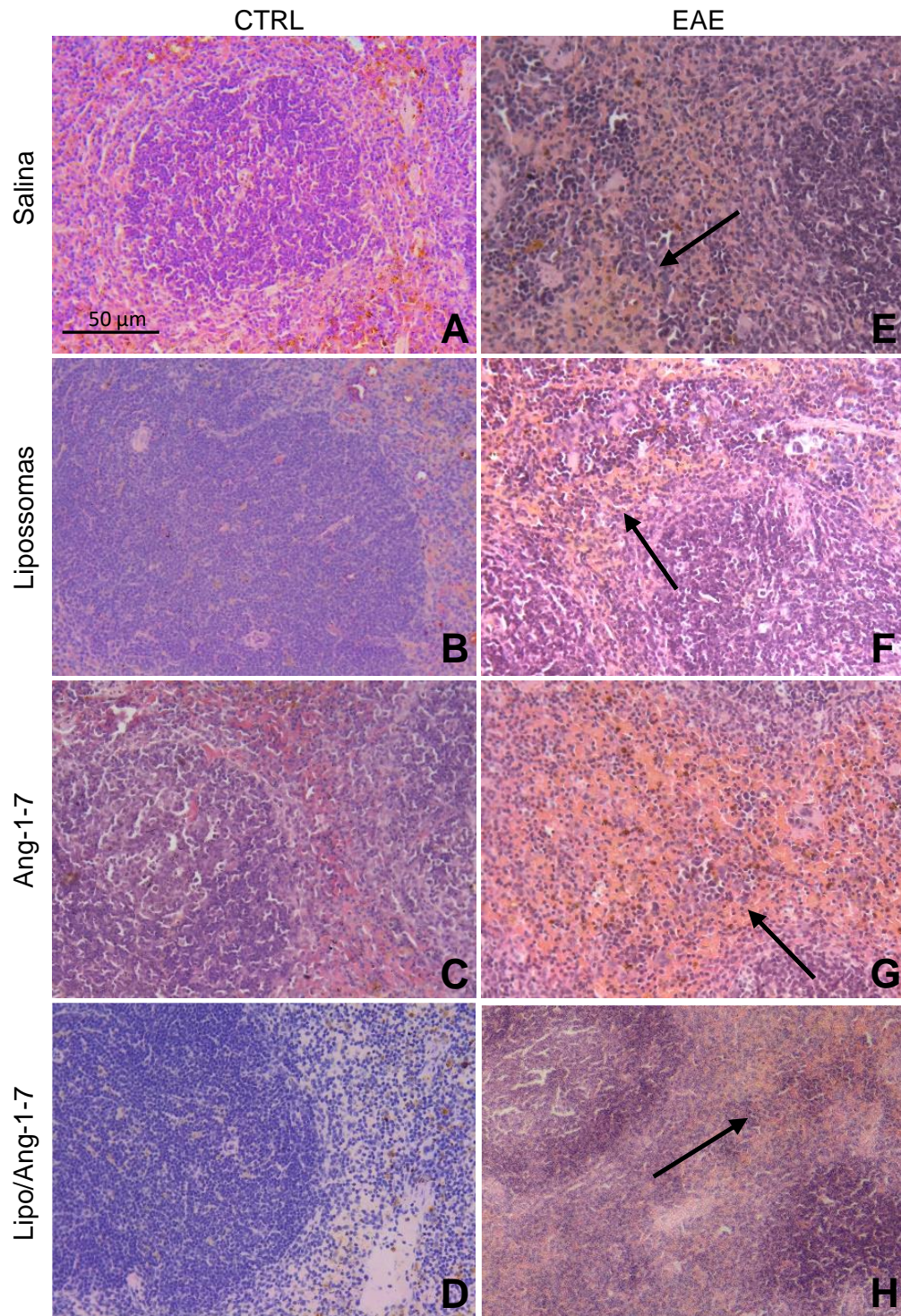


Figura 20: Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de camundongos pertencentes aos grupos CTRL/salina (A), CTRL/lipo (B), CTRL/Ang-1-7 (C), CTRL/lipo/Ang-1-7 (D), EAE/salina (E), EAE/lipo (F), EAE/Ang-1-7 (G) e EAE/lipo/Ang-1-7 (H). Em A, B, C e D observa-se quadro histológico compatível com normalidade; em E, F, G e H observa-se hiperplasia da polpa vermelha com desorganização da polpa branca. Hematoxilina Eosina, barra = 50 μ m.

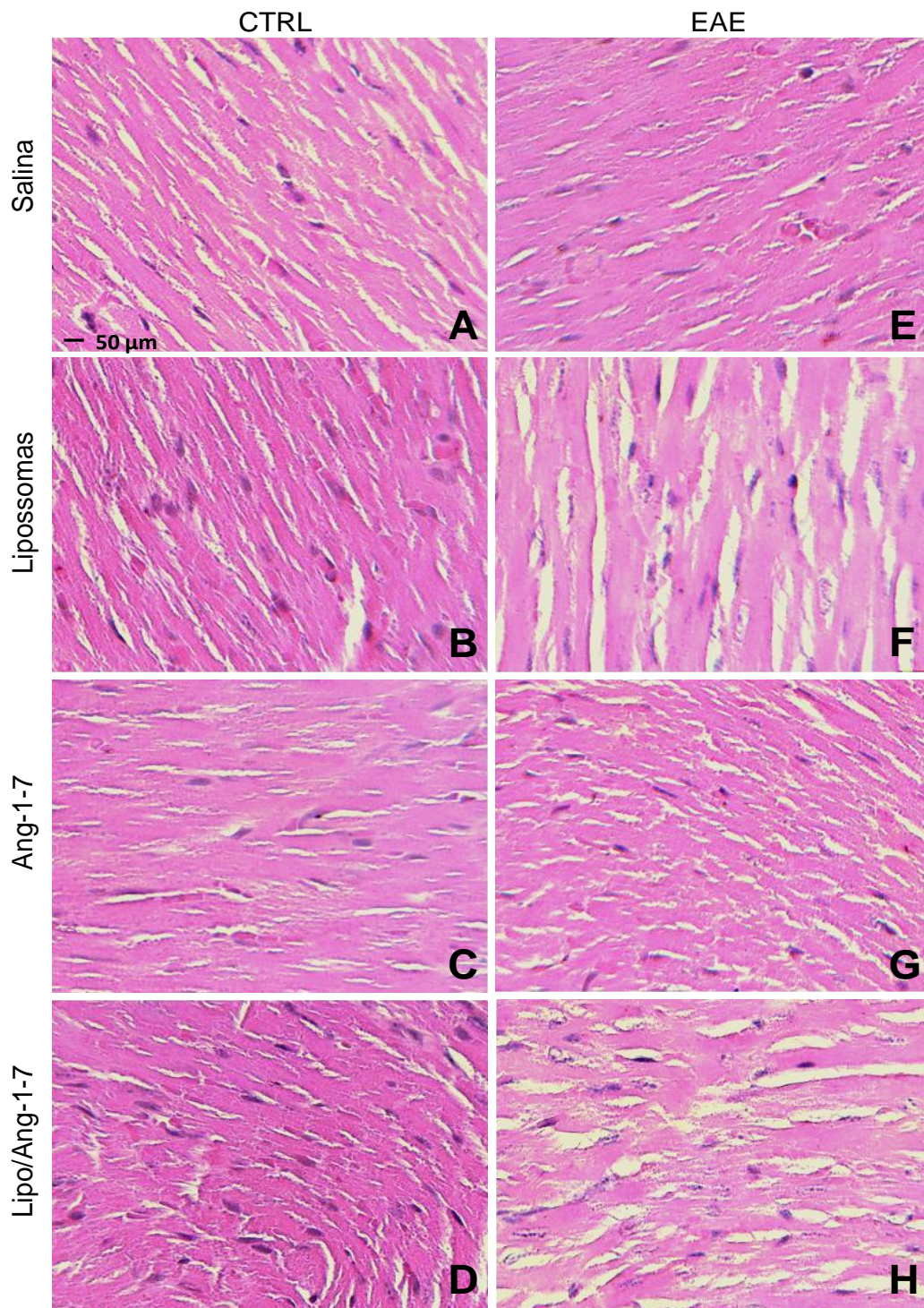


Figura 21: Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de camundongos pertencentes aos grupos CTRL/salina (A), CTRL/lipo (B), CTRL/Ang-1-7 (C), CTRL/lipo/Ang-1-7 (D), EAE/salina (E), EAE/lipo (F), EAE/Ang-1-7 (G) e EAE/lipo/Ang-1-7 (H). Observa-se quadro histológico compatível com normalidade. Hematoxilina Eosina, barra = 50µm.

3.5 Discussão

A EM é uma doença neurológica crônica, imprevisível, autoimune, que se caracteriza pela destruição da bainha de mielina mediada por células T CD4⁺ e CD8⁺ autorreativas. A doença é definida pela presença de infiltrado inflamatório, desmielinização e dano axonal, levando a disfunção neurológica progressiva e incapacidade física permanente. Sendo assim, é inquestionável o efeito dos déficits neurológicos advindos da progressão da EM, causando impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (Stone et al., 2020).

Os lipossomas consistem em uma ferramenta eficaz para a entrega direcionada de drogas para um determinado alvo, apresentando como vantagens, não só a possibilidade de aumento da estabilidade do medicamento e a ausência de biotoxicidade, mas também a alta permeabilidade pela membrana celular (Jourghanian, Ghaffari, Ardjmand, Haghghat, & Mohammadnejad, 2016). Nesse trabalho, a via de administração das nanoestruturas, foi a nebulização. Recentemente, a via inalatória tem recebido maior atenção quando comparado com as vias orais e parenterais. Primeiramente, a mucosa nasal é altamente vascularizada e imunogênica permitindo rápida absorção e início de ação do fármaco. Segundo, essa via permite a entrega do medicamento diretamente ao SNC, sem necessariamente, ter que atravessar a BHE, reduzindo, dessa forma, os efeitos colaterais sistêmicos (Dong, Shang, Inthavong, Chan, & Tu, 2017; Illum, 2012; Kumar, Pandey, & Jain, 2016).

Os lipossomas vazios e com Ang-1-7 utilizados nesse estudo apresentaram um diâmetro médio de 122,4 nm e 132,8 nm, respectivamente, e um PDI de 0,029 e 0,022, respectivamente. O PDI é um parâmetro que fornece informações sobre a estabilidade física e sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos nas nanoestruturas. Suspensões com estabilidade a longo prazo, tendem a ter valores de PDI entre 0,1-0,25. Um PDI abaixo de 0,3 indica a formação de sistemas monodispersos, enquanto que valores acima de 0,5 revelam ampla distribuição do tamanho de partícula, caracterizando baixa estabilidade física (da Silva Santos, Badan Ribeiro, & Andrade Santana, 2019; Ojha & Kumar, 2018). O diâmetro médio das nanopartículas tende a variar em função do tipo de nanocarreador lipídico utilizado (Nemen & Lemos-Senna, 2011). Neste estudo, tanto os lipossomas vazios, quanto os lipossomas com Ang-1-7

apresentaram um PDI menor que 0,3, pode-se inferir que tratam-se de sistemas monodispersos.

Ao longo do período de monitoramento da progressão clínica da EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅, observou-se que a administração inalatória de lipossomas contendo Ang-1-7 foi capaz de atenuar os sinais clínicos da doença, reduzir a perda de peso associada ao processo inflamatório, além de melhorar a capacidade motora e de reduzir o comportamento ansioso dos animais. Além disso, pode-se evidenciar que os animais pertencentes ao grupo EAE/lipo demonstraram escore clínico e peso corporal semelhantes ao grupo EAE/salina. De fato, já é bem caracterizado e evidente na literatura que animais com EAE apresentam aumento do escore clínico neurológico, redução da capacidade motora, além de exibirem um comportamento do tipo ansioso (Bernardes, et al., 2016; Peres et al., 2021; Stone, et al., 2020; Takemiya & Takeuchi, 2013). A administração inalatória de Ang-1-7 encapsulada por lipossomas também foi capaz reduzir o comportamento ansioso dos animais e de atenuar a perda motora. Corroborando com nossos resultados, estudo realizado em ratos transgênicos com baixas concentrações cerebrais de angiotensinogênio demonstrou que a administração intracerebroventricular (icv) de 1.0 μ l de Ang-1-7 (2 mg/ml) reverteu a ansiedade e depressão dos animais (Kangussu et al., 2013). Outro recente estudo também evidenciou efeitos ansiolíticos da Ang-1-7 (0.5 μ g em 0.5 μ L), incluindo o aumento do tempo na zona central no teste de campo aberto, quando administrada por via icv em ratos estressados (Zhu et al., 2020).

Diversos estudos realizados com modelo animal de isquemia/hemorragia cerebral evidenciaram redução da gravidade da doença através da terapia com Ang-1-7. Entretanto, diferentemente do nosso trabalho, nestes estudos prévios, a via de administração mais comumente utilizada foi a intracerebrovascular (icv) (Bennion, et al., 2018; Jiang et al., 2014; Mecca et al., 2011; Regenhardt et al., 2014). Dados anteriores relataram a associação entre SRA e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Almeida-Santos, et al., 2017; Mogi & Horiuchi, 2013; Saavedra, 2016). Segundo GUO e colaboradores (2017), animais com EAE apresentaram um aumento significativo da concentração de Ang II no soro (Guo, Namekata, Kimura, Harada, & Harada, 2017). A Ang II é capaz de aumentar o estresse oxidativo celular e mitocondrial e ativar o NF- κ B, promovendo a produção de citocinas inflamatórias e apoptose celular (Forrester et al., 2018; Gironacci, et al., 2018). Estudo prévio,

também demonstrou que o bloqueio de ECA e AT1 suprime células Th1 e Th17 autorreativas, promove a ativação de células T regulatórias (Tregs) CD4⁺ FoxP3⁺ antígeno-específicas e inibe a via inflamatória do NF-κB (Platten et al., 2009). Atualmente, ainda não está bem elucidado na literatura a função e mecanismo de ação da Ang-1-7 em doenças neurodegenerativas como a EAE (Goldstein, et al., 2016). No entanto, sabe-se que o receptor Mas, quando ativado pela Ang-1-7, pode inibir o receptor AT1, o que aumenta a expressão de ECA 2, Ang-1-7 e do receptor Mas, culminando com a redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6 e aumento da citocina anti-inflamatória, IL-10 (Simões e Silva, et al., 2013). Além disso, a Ang-1-7 é capaz de reduzir a liberação do ânion superóxido, apresentando efeitos antioxidantes (Bian, et al., 2013; Galandrin et al., 2016; Khajah, et al., 2017). Recente estudo revelou que o tratamento subcutâneo ou por mini-bomba osmótica de Ang-1-7 em camundongos C57BL/6 EAE reduziu a severidade da doença, atenuando o infiltrado inflamatório, desmielinização e dano axonal na medula espinal apenas em animais WT para o receptor Mas, confirmando que o efeito benéfico da Ang-1-7 é via modulação do receptor Mas (Lund et al., 2019). No entanto, vale ressaltar que as mais eficazes doses encontradas nesse estudo foram de 2 mg/kg/dia para o tratamento subcutâneo e 1 mg/kg/dia para o tratamento através das mini-bombas osmóticas, o que corresponde a uma dose, respectivamente, de 11 e 5,5 vezes maior (normalizada por 20 gramas) do que a utilizada no presente trabalho (1,8µg/ml/animal com aproximadamente 20 gramas, a cada 72 horas).

Entretanto, a administração inalatória de Ang-1-7 não encapsulada em lipossomas não foi capaz de atenuar o escore clínico e a perda de peso dos animais com EAE. Esse efeito pode ser explicado considerando a rápida inativação e degradação por diversas proteínas proteases, a Ang-1-7 possui um curto tempo de meia-vida, correspondendo a 20 segundos e 30 minutos quando administrada de forma intravenosa em roedores e humanos, respectivamente (Duan et al., 2020; Lusuf, Henning, van Gilst, & Roks, 2008). Além disso, a baixa lipossolubilidade associada à baixa capacidade em atravessar barreiras fisiológicas, limita o uso de peptídeos para o tratamento de diversas condições patológicas, sendo necessário o desenvolvimento e uso de estratégias de direcionamento de fármacos (Márquez-Miranda et al., 2017), como os lipossomas utilizados neste trabalho.

As células endoteliais que revestem a microvasculatura do SNC diferem fundamentalmente de outros endotélios vasculares em sua capacidade de regular a passagem de moléculas e células para o parênquima neural, uma vez que são componentes da BHE. Proteínas como Claudina-5 e ZO-1 são essenciais para manutenção da estrutura e função da BHE. Essas proteínas são capazes de formar junções de oclusão (*tight junctions*), impedindo a entrada de substâncias através da barreira (Ren et al., 2022). Avaliar a ruptura da BHE é de suma importância para a compreensão de mecanismos inflamatórios acoplados à patologias neurológicas e, conseqüentemente, para desenvolver estratégias terapêuticas que possam tratar ou prevenir essas doenças. Atualmente, existem evidências de que na EM ocorre uma destruição da BHE, aumentando o extravasamento de células inflamatórias para o SNC (Cramer, et al., 2015; Dargahi, et al., 2017). De forma interessante, e, potencialmente justificando a melhora clínica, encontrou-se que os animais EAE nebulizados com Ang-1-7 em lipossomas, apresentaram redução da permeabilidade vascular cerebral quando comparados ao grupo EAE/salina, ou seja, obtiveram uma preservação da integridade funcional da BHE. Corroborando com nossos resultados, estudo realizado por WU *et al.*, (2015) demonstrou que a administração icv de Ang-1-7 em modelos de oclusão da artéria cerebral média reduziu a permeabilidade da BHE, a qual foi avaliada da mesma forma que no presente estudo, por meio da técnica de Azul de Evans (Wu, Zhao, Wu, & Wang, 2015). Esse mesmo estudo também demonstrou uma elevação da expressão gênica e proteica de Claudina-5 e ZO-1 após o tratamento com Ang-1-7, confirmando o efeito protetor deste peptídeo sobre a BHE.

O provável mecanismo associado à disfunção da integridade da BHE e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade vascular na EM, está relacionado ao dano endotelial mediado em parte pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-17, IL-22, TNF- α e IL-6 (Alvarez, Cayrol, & Prat, 2011). Nesse contexto, ao avaliar os níveis cerebrais e medulares de IL-6, IL-17, TNF- α , IL-1 β e IL-10 observou-se que o grupo EAE submetido a administração inalatória de Ang-1-7 em lipossomas apresentou redução das concentrações de IL-6 cerebral e TNF- α medular, além de aumentar estatisticamente os níveis de IL-10 nesses dois órgãos em comparação com o grupo EAE/salina. Ang-1-7 atua na inibição a via de sinalização do NF- κ B, causando redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Bihl et al., 2015). Corroborando com estes dados, estudo recente demonstrou que a

administração sc de 50 µg/kg/dia e 500 µg/kg/dia de Ang-1-7 reduziu as concentrações plasmáticas de TNF-α em camundongos C57BL/6 modelos de infarto do miocárdio (Hoyer-Kimura et al., 2021). Outro estudo também revelou redução das concentrações sorológicas de TNF-α associada ao aumento de IL-10 após o tratamento icv de Ang-1-7 em ratos endotoxêmicos induzidos por LPS (Passaglia et al., 2020).

O processo de interação leucócito-endotélio *in vivo* tem sido amplamente investigado através da técnica da microscopia intravital. Esse método permite a visualização de processos de rolamento, adesão e, em algumas circunstâncias, transmigração de células do vaso sanguíneo em direção ao tecido (Kolaczowska & Kubes, 2013). Na busca pelo entendimento dos mecanismos celulares associados ao atenuado escore clínico dos animais EAE tratados com Ang-1-7 em lipossomas, foi realizada uma análise *in vivo* dos eventos de rolamento e adesão na microvasculatura do SNC. Corroborando dados anteriores do nosso grupo de pesquisa (Bernardes, et al., 2013), os animais EAE apresentaram um aumento do rolamento e da adesão leucocitária na microvasculatura medular quando comparados com os demais grupos CTRL. No entanto, de forma inesperada, evidenciamos que o grupo EAE/lipo/Ang-1-7 demonstrou um aumento mais acentuado no rolamento e adesão de leucócitos nas vênulas centrais quando comparado com o grupo EAE/salina.

Sabe-se que as células Treg apresentam propriedades imunossupressoras sendo capazes de atuar por meio de diversos mecanismos como na produção de citocinas imunomoduladoras (IL-10 e TGF-β) e na supressão de várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (Azimi, Ghabaee, Moghadasi, Noorbakhsh, & Izad, 2018; Y. C. Kim et al., 2018; Shevyrev & Tereshchenko, 2019). Esses tipos celulares são capazes de controlar a atividade inflamatória excessiva, suprimindo o desenvolvimento de doenças autoimunes. Estudos demonstram que as células Treg apresentam uma frequência reduzida e prejuízo funcional em pacientes com EM, no entanto, a causa dessas alterações ainda permanece desconhecida (Kimura, Hohjoh, & Yamamura, 2018; Sambucci et al., 2018). Considerando o aumento do rolamento e da adesão de leucócitos induzido pela Ang-1-7 em lipossomas associado ao aumento das concentrações medulares de IL-10, foi levantada a hipótese que, possivelmente, a administração inalatória do peptídeo encapsulado foi capaz de recrutar células Treg para o parênquima medular

com o objetivo de regular a exacerbação do processo inflamatório evidenciado nos animais EAE. De fato, estudo prévio demonstrou que o bloqueio da ação da Ang II através de inibidores da ECA ou ARB1s favoreceu o aumento de células Treg em animais EAE além de suprimir células Th1 e Th17 autorreativas (Lumbers et al., 2022). Por sua vez, a Ang-1-7, através de alguns mecanismos como a heterodimerização entre os receptores Mas e AT1 ou a inibição direta da ligação da Ang II ao receptor AT1, é capaz de atuar como um antagonista do eixo Ang II/ AT1, desencadeando efeitos antiinflamatórios e neuroprotetores (Gaidarov et al., 2018).

Após determinar a eficácia farmacologia da Ang-1-7 encapsulada por lipossomas em atenuar a resposta autoimune associada a EAE no SNC, o próximo passo foi avaliar os possíveis efeitos toxicológicos pulmonares advindos da via de administração inalatória. Assim, primeiramente, foram avaliados a permeabilidade vascular pulmonar, os níveis de citocinas inflamatórias e a quantificação dos linfócitos, macrófagos e leucócitos totais no parênquima pulmonar. Como observado e pela primeira vez descrito, os animais EAE/salina apresentaram um aumento da permeabilidade vascular pulmonar, assim como das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-17 e da quantidade de células inflamatórias, quando comparados com os grupos CTRL. Por sua vez, a administração de lipossomas contendo Ang-1-7 foi capaz de atenuar essas alterações. Diversos estudos tem demonstrado o efeito antiinflamatório do tratamento com Ang-1-7 em diferentes condições patológicas pulmonares principalmente no que diz respeito à redução de citocinas pró-inflamatórias e da concentração de leucócitos totais, corroborando com os resultados observados neste trabalho (Bastos et al., 2020; Magalhaes, et al., 2018; Rago et al., 2019). A partir desses dados, verificou-se se ao aumento do processo inflamatório pulmonar evidenciado nos modelos EAE poderia afetar a função pulmonar dos animais. Assim, para isso, foram avaliados os parâmetros fisiológicos pulmonares, incluindo a capacidade inspiratória, capacidade residual funcional e a resistência pulmonar. Interessantemente, os dados evidenciaram que os animais EAE/salina apresentaram redução da capacidade inspiratória e da capacidade residual funcional, além de um aumento na resistência pulmonar quando comparado com o grupo CTRL/salina. Mais uma vez, a Ang-1-7 em lipossomas foi capaz de abrandar essas alterações respiratórias, nomeadamente a capacidade residual funcional e a resistência pulmonar. Estudo prévio demonstrou que a administração oral de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$

de Ang-1-7 encapsulado pelo oligossacarídeo HP β CD reduziu consideravelmente a resistência pulmonar em modelo animal de fibrose (Rago, et al., 2019). Vários estudos sugerem que o pulmão pode ser responsável por um papel essencial na autoimunidade (Kuehl et al., 2017; Thati, et al., 2015). Fatores associados diretamente ao pulmão, incluindo exposição a poluentes aéreos, cigarro, infecções pulmonares e nicotina acredita-se que pode ser o gatilho inicial para o desenvolvimento da EM (Vijitha & Engel, 2019). Segundo Odoardi (2012), antes da entrada de células T autorreativas no SNC, estas se estabelecem no pulmão, reativam e adquirem a capacidade de entrar no CNS (Odoardi et al., 2012). De fato, o pulmão possui um ambiente imunológico único que mantém a homeostase do corpo, inibindo as respostas imunológicas exacerbadas contra estímulos externos (Kanayama, He, & Shinohara, 2015). No entanto, o papel do sistema imunológico pulmonar no desenvolvimento do processo inflamatório autoimune no SNC ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que Ang-1-7 é capaz de atenuar o processo inflamatório pulmonar em diversos modelos animais que mimetizam patologias pulmonares (Magalhaes, et al., 2018; Onal et al., 2022; Zambelli et al., 2015). Nesse aspecto, os resultados obtidos sugerem que, além de atuar diretamente no SNC, a Ang-1-7 em lipossomas podem ter atuado no pulmão através, por exemplo, da redução do processo inflamatório (redução da permeabilidade vascular pulmonar e das concentrações de TNF- α), ocasionando em menor reativação de células inflamatórias pulmonares (redução de linfócitos e leucócitos totais) e, conseqüentemente, menor resposta autoimune no SNC (redução da perda de peso, ansiedade e escore clínico). Além disso, as evidências do presente estudo também demonstraram que os grupos CTRL tratados com nanoestruturas contendo ou não Ang-1-7 não apresentaram toxicidade pulmonar quando avaliado a resposta inflamatória e a mecânica respiratória, demonstrando baixos efeitos adversos a nível pulmonar.

A respeito de possível toxicidade sistêmica associada a administração por via inalatória, não foi observado diferenças histológicas a nível esplênico nem cardíaco entre os grupos controles, garantindo, mais uma vez, a segurança e baixa toxicidade da propedêutica em questão. Nas análises histológicas esplênicas foi observada hiperplasia da polpa vermelha com desorganização da polpa branca em todos grupos EAE. Recente estudo sugeriu uma interrelação do eixo baço-cérebro, incluindo em doenças autoimunes como a EM (Wei, et al., 2022). Segundo He et al., 2014, animais

com EAE apresentam um aumento da população de células mieloides supressoras esplênicas que, por sua vez, atuam na imunossupressão da resposta inflamatória associada a EAE (He et al., 2014). Assim, como também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em relação à permeabilidade vascular do baço, as alterações histopatológicas esplênicas encontradas, possivelmente, estão associadas ao aumento da resposta imunossupressora relacionada diretamente à EAE e não à terapia em questão, visto que apenas os animais EAE apresentaram tais alterações.

Em suma, os dados demonstraram, de forma inédita, a eficácia da Ang-1-7 em lipossomas no tratamento de animais EAE quando administrado por via inalatória, atuando na redução da resposta inflamatória pulmonar e no SNC.

4. CONCLUSÃO GERAL

Nossos resultados demonstraram que a administração inalatória tanto do DMF em SLN, quanto da Ang-1-7 em lipossomas foram eficazes no tratamento de modelos animais de EM, conforme evidenciado na melhora do escore clínico, peso corporal e da resposta inflamatória. Observamos também que as SLN e os lipossomas não apresentaram toxicidade pulmonar. De forma inédita, nossos resultados conseguiram demonstrar que o pulmão de animais EAE apresentou um aumento do processo inflamatório, assim como, uma piora da função pulmonar, e que o DMF em SLN e a Ang-1-7 em lipossomas foram capazes de atenuar esses fenótipos. A nebulização dessas nanoestruturas pode ser um futuro potencial agente terapêutico para o tratamento da EM, pois além de diminuir a resposta inflamatória e progressão da doença, essa estratégia indolor de administração de medicamentos pode otimizar a continuidade ao tratamento, aumentando a efetividade do fármaco e consequentemente, melhorando a qualidade de vida do paciente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar, S., Chandrasekhar, B., Attur, S., Dhaunsi, G. S., Yousif, M. H., & Benter, I. F. (2015). Transactivation of ErbB Family of Receptor Tyrosine Kinases Is Inhibited by Angiotensin-(1-7) via Its Mas Receptor. *PLoS One*, *10*(11), e0141657. doi: 10.1371/journal.pone.0141657
- Al-Ahmady, Z. S., Dickie, B. R., Aldred, I., Jasim, D. A., Barrington, J., Haley, M., . . . Allan, S. M. (2022). Selective brain entry of lipid nanoparticles in haemorrhagic stroke is linked to biphasic blood-brain barrier disruption. *Theranostics*, *12*(10), 4477-4497. doi: 10.7150/thno.72167
- Al-Khamis, F. A. (2016). The use of immune modulating drugs for the treatment of multiple sclerosis. *Neurosciences (Riyadh)*, *21*(1), 4-9. doi: 10.17712/nsj.2016.1.20150252
- Al Rihani, S. B., Darakjian, L. I., Deodhar, M., Dow, P., Turgeon, J., & Michaud, V. (2021). Disease-Induced Modulation of Drug Transporters at the Blood-Brain Barrier Level. *Int J Mol Sci*, *22*(7). doi: 10.3390/ijms22073742
- Aldawsari, H. M., & Singh, S. (2020). Rapid Microwave-Assisted Cisplatin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Anticancer Study. *Nanomaterials (Basel)*, *10*(3). doi: 10.3390/nano10030510
- Almeida-Santos, A. F., Kangussu, L. M., & Campagnole-Santos, M. J. (2017). The Renin-Angiotensin System and the Neurodegenerative Diseases: A Brief Review. *Protein Pept Lett*, *24*(9), 841-853. doi: 10.2174/0929866524666170822120258
- Almeida, B., Nag, O. K., Rogers, K. E., & Delehanty, J. B. (2020). Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. *Molecules*, *25*(23). doi: 10.3390/molecules25235672
- Alvarez, J. I., Cayrol, R., & Prat, A. (2011). Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, *1812*(2), 252-264. doi: 10.1016/j.bbdis.2010.06.017
- Ambhore, N. S., Satyanarayana Raju, K. R., Mulukutla, S., Yamjala, K., Mohire, S., Satyanarayana Reddy Karri, V. V., . . . Elango, K. (2017). Brain Targeting of 1,9-Pyrazoloanthrone an c-Jun-N-terminal Kinase Inhibitor Using Liposomes for Effective Management of Parkinson's Disease. *Iran J Pharm Res*, *16*(4), 1463-1478.

- Andrade, S., Ramalho, M. J., Loureiro, J. A., & Pereira, M. C. (2022). Transferrin-functionalized liposomes loaded with vitamin VB12 for Alzheimer's disease therapy. *Int J Pharm*, 626, 122167. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122167
- Arroja, M. M. C., Reid, E., Roy, L. A., Vallatos, A. V., Holmes, W. M., Nicklin, S. A., . . . McCabe, C. (2019). Assessing the effects of Ang-(1-7) therapy following transient middle cerebral artery occlusion. *Sci Rep*, 9(1), 3154. doi: 10.1038/s41598-019-39102-8
- Auricchio, F., Scavone, C., Cimmaruta, D., Di Mauro, G., Capuano, A., Sportiello, L., & Rafaniello, C. (2017). Drugs approved for the treatment of multiple sclerosis: review of their safety profile. *Expert Opin Drug Saf*, 16(12), 1359-1371. doi: 10.1080/14740338.2017.1388371
- Ayatollahi, A. M., Haji Molla Hoseini, M., Ghanadian, S. M., Kosari-Nasab, M., Mami, F., Yazdiniapoure, Z., . . . Salari, A. A. (2017). TAMEC: a new analogue of cyclomyrsinol diterpenes decreases anxiety- and depression-like behaviors in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurol Res*, 39(12), 1056-1065. doi: 10.1080/01616412.2017.1376789
- Ayrignac, X., Bilodeau, P. A., Prat, A., Girard, M., Labauge, P., Le Lorier, J., . . . Duquette, P. (2019). Assessing the risk of multiple sclerosis disease-modifying therapies. *Expert Rev Neurother*, 19(7), 695-706. doi: 10.1080/14737175.2019.1627201
- Azimi, M., Ghabaee, M., Moghadasi, A. N., Noorbakhsh, F., & Izad, M. (2018). Immunomodulatory function of Treg-derived exosomes is impaired in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Immunol Res*, 66(4), 513-520. doi: 10.1007/s12026-018-9008-5
- Balasa, R., Barcutean, L., Mosora, O., & Manu, D. (2021). Reviewing the Significance of Blood-Brain Barrier Disruption in Multiple Sclerosis Pathology and Treatment. *Int J Mol Sci*, 22(16). doi: 10.3390/ijms22168370
- Bastos, A. C., Magalhães, G. S., Gregório, J. F., Matos, N. A., Motta-Santos, D., Bezerra, F. S., . . . Rodrigues-Machado, M. G. (2020). Oral formulation angiotensin-(1-7) therapy attenuates pulmonary and systemic damage in mice with emphysema induced by elastase. *Immunobiology*, 225(2), 151893. doi: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.12.002>

- Battaglia, L., Panciani, P. P., Muntoni, E., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., De Bonis, P., . . . Swaminathan, S. (2018). Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, *15*(4), 369-378. doi: 10.1080/17425247.2018.1429401
- Beecham, A. H., Patsopoulos, N. A., Xifara, D. K., Davis, M. F., Kempainen, A., Cotsapas, C., . . . McCauley, J. L. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*, *45*(11), 1353-1360. doi: 10.1038/ng.2770
- Bennion, D. M., Jones, C. H., Donnangelo, L. L., Graham, J. T., Isenberg, J. D., Dang, A. N., . . . Sumners, C. (2018). Neuroprotection by post-stroke administration of an oral formulation of angiotensin-(1-7) in ischaemic stroke. *Exp Physiol*, *103*(6), 916-923. doi: 10.1113/ep086957
- Bernardes, D., Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Karmally, S., Dellarole, A., Carvalho-Tavares, J., & Bethea, J. R. (2016). Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*, *136 Suppl 1*, 63-73. doi: 10.1111/jnc.13354
- Bernardes, D., Oliveira-Lima, O. C., Silva, T. V., Faraco, C. C., Leite, H. R., Juliano, M. A., . . . Carvalho-Tavares, J. (2013). Differential brain and spinal cord cytokine and BDNF levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise. *J Neuroimmunol*, *264*(1-2), 24-34. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.08.014
- Bettelli, E., Das, M. P., Howard, E. D., Weiner, H. L., Sobel, R. A., & Kuchroo, V. K. (1998). IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol*, *161*(7), 3299-3306.
- Bhaumik, S., Mickael, M. E., Moran, M., Spell, M., & Basu, R. (2021). ROR γ t Promotes Foxp3 Expression by Antagonizing the Effector Program in Colonic Regulatory T Cells. *J Immunol*, *207*(8), 2027-2038. doi: 10.4049/jimmunol.2100175
- Bian, W., Sun, L., Yang, L., Li, J. F., Hu, J., Zheng, S., . . . He, J. (2013). Stabilization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas through interaction with PSD95. *Biochem J*, *453*(3), 345-356. doi: 10.1042/bj20121885

- Bihl, J. C., Zhang, C., Zhao, Y., Xiao, X., Ma, X., Chen, Y., . . . Chen, Y. (2015). Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NFκB inflammatory pathway. *Vascul Pharmacol*, 73, 115-123. doi: 10.1016/j.vph.2015.08.007
- Binda, A., Panariti, A., Barbuti, A., Murano, C., Dal Magro, R., Masserini, M., . . . Rivolta, I. (2018). Modulation of the intrinsic neuronal excitability by multifunctional liposomes tailored for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*, 13, 4059-4071. doi: 10.2147/ijn.S161563
- Biolato, M., Bianco, A., Lucchini, M., Gasbarrini, A., Mirabella, M., & Grieco, A. (2021). The Disease-Modifying Therapies of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis and Liver Injury: A Narrative Review. *CNS Drugs*, 35(8), 861-880. doi: 10.1007/s40263-021-00842-9
- Biotti, D., & Ciron, J. (2018). First-line therapy in relapsing remitting multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*, 174(6), 419-428. doi: 10.1016/j.neurol.2018.03.012
- Bittner, S., Afzali, A. M., Wiendl, H., & Meuth, S. G. (2014). Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp*(86). doi: 10.3791/51275
- Bjelobaba, I., Begovic-Kupresanin, V., Pekovic, S., & Lavrnja, I. (2018). Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, 96(6), 1021-1042. doi: 10.1002/jnr.24224
- Blad, C. C., Tang, C., & Offermanns, S. (2012). G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 11(8), 603-619. doi: 10.1038/nrd3777
- Brambilla, R. (2019). The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol*, 137(5), 757-783. doi: 10.1007/s00401-019-01980-7
- Branchi, I., Alleva, E., & Costa, L. G. (2002). Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. *Neurotoxicology*, 23(3), 375-384. doi: 10.1016/s0161-813x(02)00078-5
- Callegari, I., Derfuss, T., & Galli, E. (2021). Update on treatment in multiple sclerosis. *Presse Med*, 50(2), 104068. doi: 10.1016/j.lpm.2021.104068

- Campa, C. C., Silva, R. L., Margaria, J. P., Pirali, T., Mattos, M. S., Kraemer, L. R., . . . Hirsch, E. (2018). Inhalation of the prodrug PI3K inhibitor CL27c improves lung function in asthma and fibrosis. *Nature Communications*, *9*(1), 5232. doi: 10.1038/s41467-018-07698-6
- Carvalho-Tavares, J., Hickey, M. J., Hutchison, J., Michaud, J., Sutcliffe, I. T., & Kubes, P. (2000). A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res*, *87*(12), 1141-1148. doi: 10.1161/01.res.87.12.1141
- Cataldi, M., Vigliotti, C., Mosca, T., Cammarota, M., & Capone, D. (2017). Emerging Role of the Spleen in the Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies, Nanoparticles and Exosomes. *International journal of molecular sciences*, *18*(6), 1249. doi: 10.3390/ijms18061249
- Cellerino, M., Boffa, G., Lapucci, C., Tazza, F., Sbragia, E., Mancuso, E., . . . Inglese, M. (2021). Predictors of Ocrelizumab Effectiveness in Patients with Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*, *18*(4), 2579-2588. doi: 10.1007/s13311-021-01104-8
- Chountoulesi, M., & Demetzos, C. (2020). Promising Nanotechnology Approaches in Treatment of Autoimmune Diseases of Central Nervous System. *Brain Sci*, *10*(6). doi: 10.3390/brainsci10060338
- Clerico, M., Barbero, P., Contessa, G., Ferrero, C., & Durelli, L. (2007). Adherence to interferon-beta treatment and results of therapy switching. *J Neurol Sci*, *259*(1-2), 104-108. doi: 10.1016/j.jns.2006.05.075
- Cohan, S. L., Lucassen, E. B., Romba, M. C., & Linch, S. N. (2019). Daclizumab: Mechanisms of Action, Therapeutic Efficacy, Adverse Events and Its Uncovering the Potential Role of Innate Immune System Recruitment as a Treatment Strategy for Relapsing Multiple Sclerosis. *Biomedicines*, *7*(1). doi: 10.3390/biomedicines7010018
- Cramer, S. P., Modvig, S., Simonsen, H. J., Frederiksen, J. L., & Larsson, H. B. (2015). Permeability of the blood-brain barrier predicts conversion from optic neuritis to multiple sclerosis. *Brain*, *138*(Pt 9), 2571-2583. doi: 10.1093/brain/awv203
- Cunha, S., Almeida, H., Amaral, M. H., Lobo, J. M. S., & Silva, A. C. (2017). Intranasal lipid nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des*. doi: 10.2174/1381612824666171128105305

- da Silva Santos, V., Badan Ribeiro, A. P., & Andrade Santana, M. H. (2019). Solid lipid nanoparticles as carriers for lipophilic compounds for applications in foods. *Food Res Int*, *122*, 610-626. doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.032
- Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M. E., de Courten, M., Matsoukas, J., & Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sci*, *7*(7). doi: 10.3390/brainsci7070078
- de Chalus, A., Taveira, M., & Deiva, K. (2021). Pediatric onset multiple sclerosis: Future challenge for early diagnosis and treatment. *Presse Med*, *50*(2), 104069. doi: 10.1016/j.lpm.2021.104069
- DellaValle, B., Manresa-Arraut, A., Hasseldam, H., Stensballe, A., Rungby, J., Larsen, A., & Hempel, C. (2018). Detection of Glycan Shedding in the Blood: New Class of Multiple Sclerosis Biomarkers? *Front Immunol*, *9*, 1254. doi: 10.3389/fimmu.2018.01254
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, *15*(9), 545-558. doi: 10.1038/nri3871
- Dolati, S., Babaloo, Z., Jadidi-Niaragh, F., Ayromlou, H., Sadreddini, S., & Yousefi, M. (2017). Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems. *Biomed Pharmacother*, *86*, 343-353. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.010
- Dong, J., Shang, Y., Inthavong, K., Chan, H. K., & Tu, J. (2017). Numerical Comparison of Nasal Aerosol Administration Systems for Efficient Nose-to-Brain Drug Delivery. *Pharm Res*, *35*(1), 5. doi: 10.1007/s11095-017-2280-6
- Dopkins, N., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2018). The role of gut microbiome and associated metabolome in the regulation of neuroinflammation in multiple sclerosis and its implications in attenuating chronic inflammation in other inflammatory and autoimmune disorders. *Immunology*, *154*(2), 178-185. doi: 10.1111/imm.12903
- dos Santos, A. C., Barsante, M. M., Arantes, R. M., Bernard, C. C., Teixeira, M. M., & Carvalho-Tavares, J. (2005). CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study. *J Neuroimmunol*, *162*(1-2), 122-129. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.01.020
- Duan, R., Xue, X., Zhang, Q. Q., Wang, S. Y., Gong, P. Y., E, Y., . . . Zhang, Y. D. (2020). ACE2 activator diminazene aceturate ameliorates Alzheimer's disease-

- like neuropathology and rescues cognitive impairment in SAMP8 mice. *Aging (Albany NY)*, 12(14), 14819-14829. doi: 10.18632/aging.103544
- Dubrall, D., Pflock, R., Kosinska, J., Schmid, M., Bleich, M., Himmerkus, N., . . . Sachs, B. (2021). Do dimethyl fumarate and nicotinic acid elicit common, potentially HCA(2) -mediated adverse reactions? A combined epidemiological-experimental approach. *Br J Clin Pharmacol*, 87(10), 3813-3824. doi: 10.1111/bcp.14787
- Dudhipala, N., & Gorre, T. (2020). Neuroprotective Effect of Ropinirole Lipid Nanoparticles Enriched Hydrogel for Parkinson's Disease: In Vitro, Ex Vivo, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation. *Pharmaceutics*, 12(5). doi: 10.3390/pharmaceutics12050448
- Elo, P., Li, X. G., Liljenbäck, H., Gardberg, M., Moisio, O., Miner, M., . . . Roivainen, A. (2021). Efficacy and tolerability of folate-aminopterin therapy in a rat focal model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*, 18(1), 30. doi: 10.1186/s12974-021-02073-7
- Eriksson, I., Cars, T., Piehl, F., Malmström, R. E., Wettermark, B., & von Euler, M. (2018). Persistence with dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a population-based cohort study. *Eur J Clin Pharmacol*, 74(2), 219-226. doi: 10.1007/s00228-017-2366-4
- Faissner, S., & Gold, R. (2018). Efficacy and Safety of the Newer Multiple Sclerosis Drugs Approved Since 2010. *CNS Drugs*, 32(3), 269-287. doi: 10.1007/s40263-018-0488-6
- Fernández Bargiela, N., Mondelo García, C., Giménez Arufe, V., Vizoso Hermida, J. R., & Martín Herranz, I. (2020). Fingolimod in multiple sclerosis: profile of use in habitual practice. *Eur J Hosp Pharm*, 27(6), 346-349. doi: 10.1136/ejhpharm-2018-001840
- Fontes, M. A. P., Vaz, G. C., Cardoso, T. Z. D., de Oliveira, M. F., Campagnole-Santos, M. J., Dos Santos, R. A. S., . . . Frézard, F. (2018). GABA-containing liposomes: neuroscience applications and translational perspectives for targeting neurological diseases. *Nanomedicine*, 14(3), 781-788. doi: 10.1016/j.nano.2017.12.007
- Ford, H. (2020). Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Med (Lond)*, 20(4), 380-383. doi: 10.7861/clinmed.2020-0292

- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., . . . Eguchi, S. (2018). Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*, *98*(3), 1627-1738. doi: 10.1152/physrev.00038.2017
- Foschi, M., Giannini, G., Merli, E., Mancinelli, L., Zenesini, C., Viti, B., . . . Lugaresi, A. (2021). Frequency and characteristics of dysautonomic symptoms in multiple sclerosis: a cross-sectional double-center study with the validated Italian version of the Composite Autonomic Symptom Score-31. *Neurol Sci*, *42*(4), 1395-1403. doi: 10.1007/s10072-020-04620-1
- Freund, M., Walther, T., & von Bohlen und Halbach, O. (2012). Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell Tissue Res*, *348*(1), 29-35. doi: 10.1007/s00441-012-1354-3
- Fujisawa, Y., Nabekura, T., Kawachi, Y., Otsuka, F., & Onodera, M. (2011). Enforced ROR(γ)t expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity and attenuates hypersensitivity in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol*, *29*(1), 86-93.
- Gaidarov, I., Adams, J., Frazer, J., Anthony, T., Chen, X., Gatlin, J., . . . Unett, D. J. (2018). Angiotensin (1-7) does not interact directly with MAS1, but can potently antagonize signaling from the AT1 receptor. *Cell Signal*, *50*, 9-24. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.06.007
- Gajofatto, A., & Turatti, M. (2018). Investigational immunosuppressants in early-stage clinical trials for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs*, *27*(3), 273-286. doi: 10.1080/13543784.2018.1442437
- Galandrin, S., Denis, C., Boullaran, C., Marie, J., M'Kadmi, C., Pilette, C., . . . Galés, C. (2016). Cardioprotective Angiotensin-(1-7) Peptide Acts as a Natural-Biased Ligand at the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Hypertension*, *68*(6), 1365-1374. doi: 10.1161/hypertensionaha.116.08118
- Garcia-Mesa, Y., Xu, H. N., Vance, P., Gruenewald, A. L., Garza, R., Midkiff, C., . . . Kolson, D. L. (2021). Dimethyl Fumarate, an Approved Multiple Sclerosis Treatment, Reduces Brain Oxidative Stress in SIV-Infected Rhesus Macaques: Potential Therapeutic Repurposing for HIV Neuroprotection. *Antioxidants (Basel)*, *10*(3). doi: 10.3390/antiox10030416

- Gebre, A. K., Altaye, B. M., Atey, T. M., Tuem, K. B., & Berhe, D. F. (2018). Targeting Renin-Angiotensin System Against Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol*, *9*, 440. doi: 10.3389/fphar.2018.00440
- Ghasemi, N., Razavi, S., & Nikzad, E. (2017). Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J*, *19*(1), 1-10. doi: 10.22074/cellj.2016.4867
- Gironacci, M. M., Vicario, A., Cerezo, G., & Silva, M. G. (2018). The depressor axis of the renin-angiotensin system and brain disorders: a translational approach. *Clin Sci (Lond)*, *132*(10), 1021-1038. doi: 10.1042/cs20180189
- Goldschmidt, C., & McGinley, M. P. (2021). Advances in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin*, *39*(1), 21-33. doi: 10.1016/j.ncl.2020.09.002
- Goldstein, J., Carden, T. R., Perez, M. J., Taira, C. A., Höcht, C., & Gironacci, M. M. (2016). Angiotensin-(1-7) protects from brain damage induced by shiga toxin 2-producing enterohemorrhagic Escherichia coli. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *311*(6), R1173-r1185. doi: 10.1152/ajpregu.00467.2015
- Gomes, J. R., Cabrito, I., Soares, H. R., Costelha, S., Teixeira, A., Wittelsberger, A., . . . Saraiva, M. J. (2018). Delivery of an anti-transthyretin Nanobody to the brain through intranasal administration reveals transthyretin expression and secretion by motor neurons. *J Neurochem*, *145*(5), 393-408. doi: 10.1111/jnc.14332
- Goudarzvand, M., Afraei, S., Yaslianifard, S., Ghiasy, S., Sadri, G., Kalvandi, M., . . . Azizi, G. (2016). Hydroxycitric acid ameliorates inflammation and oxidative stress in mouse models of multiple sclerosis. *Neural Regen Res*, *11*(10), 1610-1616. doi: 10.4103/1673-5374.193240
- Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C., & Harada, T. (2017). The Renin-Angiotensin System Regulates Neurodegeneration in a Mouse Model of Optic Neuritis. *Am J Pathol*, *187*(12), 2876-2885. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.012
- Hammer, A., Stegbauer, J., & Linker, R. A. (2017). Macrophages in neuroinflammation: role of the renin-angiotensin-system. *Pflugers Arch*, *469*(3-4), 431-444. doi: 10.1007/s00424-017-1942-x
- Hammer, A., Yang, G., Friedrich, J., Kovacs, A., Lee, D.-H., Grave, K., . . . Stegbauer, J. (2016). Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(49), 14109-14114. doi: 10.1073/pnas.1612668113

- Harypursat, V., Zhou, Y., Tang, S., & Chen, Y. (2020). JC Polyomavirus, progressive multifocal leukoencephalopathy and immune reconstitution inflammatory syndrome: a review. *AIDS Res Ther*, *17*(1), 37. doi: 10.1186/s12981-020-00293-0
- Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *The American Journal of Medicine*, *133*(12), 1380-1390.e1382. doi: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
- He, J., Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A. J., Mishra, P. K., Fang, J., & Pan, W. (2014). Leukocyte infiltration across the blood-spinal cord barrier is modulated by sleep fragmentation in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Fluids and Barriers of the CNS*, *11*(1), 27. doi: 10.1186/2045-8118-11-27
- How Shing Koy, E., Labauge, P., Baillet, A., Prati, C., Marotte, H., & Pers, Y. M. (2021). Immunomodulation with IL-17 and TNF- α in spondyloarthritis: focus on the eye and the central nervous system. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, *13*, 1759720x211025894. doi: 10.1177/1759720x211025894
- Hoyer-Kimura, C., Konhilas, J. P., Mansour, H. M., Polt, R., Doyle, K. P., Billheimer, D., & Hay, M. (2021). Neurofilament light: a possible prognostic biomarker for treatment of vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *J Neuroinflammation*, *18*(1), 236. doi: 10.1186/s12974-021-02281-1
- Illum, L. (2012). Nasal drug delivery - recent developments and future prospects. *J Control Release*, *161*(2), 254-263. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.024
- International Evidence Manager, M., & (MSIF), S. I. F. (2020). Atlas of MS.
- Iusuf, D., Henning, R. H., van Gilst, W. H., & Roks, A. J. (2008). Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol*, *585*(2-3), 303-312. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.02.090
- Jackson, L., Eldahshan, W., Fagan, S. C., & Ergul, A. (2018). Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *Int J Mol Sci*, *19*(3). doi: 10.3390/ijms19030876
- Jamebozorgi, K., Rostami, D., Pormasoumi, H., Taghizadeh, E., Barreto, G. E., & Sahebkar, A. (2021). Epigenetic aspects of multiple sclerosis and future therapeutic options. *Int J Neurosci*, *131*(1), 56-64. doi: 10.1080/00207454.2020.1732974
- Jasiecka-Mikołajczyk, A., & Socha, P. (2020). Teriflunomide inhibits activation-induced CD25 expression on T cells and may affect Foxp3-expressing regulatory T cells.

Research in Veterinary Science, 132, 17-27. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.05.011>

- Jelodar, S., Zare Mirakabadi, A., Oryan, S., & Mohammadnejad, L. (2021). Effect of Honey Bee Venom on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as a Model for Multiple Sclerosis (MS). *Arch Razi Inst*, 76(6), 1727-1733. doi: 10.22092/ari.2021.126291.1342
- Jiang, T., Yu, J. T., Zhu, X. C., Zhang, Q. Q., Tan, M. S., Cao, L., . . . Tan, L. (2014). Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. *Br J Pharmacol*, 171(18), 4222-4232. doi: 10.1111/bph.12770
- Jourghanian, P., Ghaffari, S., Ardjmand, M., Haghghat, S., & Mohammadnejad, M. (2016). Sustained release Curcumin loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Adv Pharm Bull*, 6(1), 17-21. doi: 10.15171/apb.2016.004
- Kanayama, M., He, Y. W., & Shinohara, M. L. (2015). The lung is protected from spontaneous inflammation by autophagy in myeloid cells. *J Immunol*, 194(11), 5465-5471. doi: 10.4049/jimmunol.1403249
- Kangussu, L. M., Almeida-Santos, A. F., Bader, M., Alenina, N., Fontes, M. A., Santos, R. A., . . . Campagnole-Santos, M. J. (2013). Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Behav Brain Res*, 257, 25-30. doi: 10.1016/j.bbr.2013.09.003
- Kangussu, L. M., Guimaraes, P. S., Nadu, A. P., Melo, M. B., Santos, R. A., & Campagnole-Santos, M. J. (2015). Activation of angiotensin-(1-7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)²⁷ rats. *Neuropharmacology*, 97, 58-66. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.04.036
- Karnik, S. S., Unal, H., Kemp, J. R., Tirupula, K. C., Eguchi, S., Vanderheyden, P. M., & Thomas, W. G. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]. *Pharmacol Rev*, 67(4), 754-819. doi: 10.1124/pr.114.010454
- Khajah, M. A., Fateel, M. M., Ananthalakshmi, K. V., & Luqmani, Y. A. (2017). Anti-inflammatory action of angiotensin 1-7 in experimental colitis may be mediated

- through modulation of serum cytokines/chemokines and immune cell functions. *Dev Comp Immunol*, 74, 200-208. doi: 10.1016/j.dci.2017.05.005
- Khan, A. R., Liu, M., Khan, M. W., & Zhai, G. (2017). Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *J Control Release*, 268, 364-389. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.001
- Khosa, A., Reddi, S., & Saha, R. N. (2018). Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomed Pharmacother*, 103, 598-613. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.055
- Khoy, K., Mariotte, D., Defer, G., Petit, G., Toutirais, O., & Le Mauff, B. (2020). Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front Immunol*, 11, 549842. doi: 10.3389/fimmu.2020.549842
- Kim, J. S., Lee, G. J., Lee, T. W., Ihm, C. G., Lee, Y. H., Kim, Y. G., . . . Jeong, K. H. (2018). Observations of the Effects of Angiotensin II Receptor Blocker on Angiotensin II-Induced Morphological and Mechanical Changes in Renal Tubular Epithelial Cells Using Atomic Force Microscopy. *Biomed Res Int*, 2018, 9208795. doi: 10.1155/2018/9208795
- Kim, Y. C., Zhang, A. H., Yoon, J., Culp, W. E., Lees, J. R., Wucherpfennig, K. W., & Scott, D. W. (2018). Engineered MBP-specific human Tregs ameliorate MOG-induced EAE through IL-2-triggered inhibition of effector T cells. *J Autoimmun*, 92, 77-86. doi: 10.1016/j.jaut.2018.05.003
- Kimura, K., Hohjoh, H., & Yamamura, T. (2018). The Role for Exosomal microRNAs in Disruption of Regulatory T Cell Homeostasis in Multiple Sclerosis. *J Exp Neurosci*, 12, 1179069518764892. doi: 10.1177/1179069518764892
- Kirby, C., & Gregoriadis, G. (1984). Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. [10.1038/nbt1184-979]. *Nat Biotech*, 2(11), 979-984.
- Kobelt, G., Teich, V., Cavalcanti, M., & Canzonieri, A. M. (2019). Burden and cost of multiple sclerosis in Brazil. *PLOS ONE*, 14(1), e0208837. doi: 10.1371/journal.pone.0208837
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(3), 159-175. doi: 10.1038/nri3399
- Kuehl, C., Thati, S., Sullivan, B., Sestak, J., Thompson, M., Siahaan, T., & Berkland, C. (2017). Pulmonary Administration of Soluble Antigen Arrays Is Superior

- to Antigen in Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Pharm Sci*, 106(11), 3293-3302. doi: 10.1016/j.xphs.2017.06.008
- Kuerten, S., Jackson, L. J., Kaye, J., & Vollmer, T. L. (2018). Impact of Glatiramer Acetate on B Cell-Mediated Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, 32(11), 1039-1051. doi: 10.1007/s40263-018-0567-8
- Kumar, A., Pandey, A. N., & Jain, S. K. (2016). Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. *Drug Deliv*, 23(3), 681-693. doi: 10.3109/10717544.2014.920431
- Lacerda-Queiroz, N., Lima, O. C., Carneiro, C. M., Vilela, M. C., Teixeira, A. L., Teixeira-Carvalho, A., . . . Carvalho-Tavares, J. (2011). Plasmodium berghei NK65 induces cerebral leukocyte recruitment in vivo: an intravital microscopic study. *Acta Trop*, 120(1-2), 31-39. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.04.020
- Lai, F., Fadda, A. M., & Sinico, C. (2013). Liposomes for brain delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 10(7), 1003-1022. doi: 10.1517/17425247.2013.766714
- Lamb, Y. N. (2022). Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *Drugs*, 82(3), 323-334. doi: 10.1007/s40265-022-01672-9
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 223-244. doi: 10.1007/s00401-016-1631-4
- Lehmann-Horn, K., Kinzel, S., & Weber, M. S. (2017). Deciphering the Role of B Cells in Multiple Sclerosis-Towards Specific Targeting of Pathogenic Function. *Int J Mol Sci*, 18(10). doi: 10.3390/ijms18102048
- LeWitt, P. A., Hauser, R. A., Pahwa, R., Isaacson, S. H., Fernandez, H. H., Lew, M., . . . Oh, C. (2019). Safety and efficacy of CVT-301 (levodopa inhalation powder) on motor function during off periods in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Neurol*, 18(2), 145-154. doi: 10.1016/s1474-4422(18)30405-8
- Leyva-Gómez, G., Piñón-Segundo, E., Mendoza-Muñoz, N., Zambrano-Zaragoza, M. L., Mendoza-Elvira, S., & Quintanar-Guerrero, D. (2018). Approaches in Polymeric Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery: A Review of the State of the Art. *Int J Mol Sci*, 19(6). doi: 10.3390/ijms19061549
- Li, R., Lu, F., Sun, X., He, L., Duan, H., Peng, W., & Wu, C. (2022). Development and in vivo Evaluation of Hydroxy- α -Sanshool Intranasal Liposomes as a Potential

- Remedial Treatment for Alzheimer's Disease. *Int J Nanomedicine*, 17, 185-201. doi: 10.2147/ijn.S339979
- Li, X. L., Zhang, B., Liu, W., Sun, M. J., Zhang, Y. L., Liu, H., & Wang, M. X. (2020). Rapamycin Alleviates the Symptoms of Multiple Sclerosis in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Through Mediating the TAM-TLRs-SOCS Pathway. *Front Neurol*, 11, 590884. doi: 10.3389/fneur.2020.590884
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., . . . Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481-487. doi: 10.1038/nature21029
- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D., & Constantin, G. (2018). Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*, 135(3), 311-336. doi: 10.1007/s00401-018-1815-1
- Lin, B., Launder, D., Bailey, D. Y., Assifuah, F. K., Miller, O. A., Conti, H. R., . . . Koffman, B. M. (2020). Targeting macrophages by an aza-anthrapyrazole to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler Relat Disord*, 43, 102190. doi: 10.1016/j.msard.2020.102190
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lumbers, E. R., Head, R., Smith, G. R., Delforce, S. J., Jarrott, B., J, H. M., & Pringle, K. G. (2022). The interacting physiology of COVID-19 and the renin-angiotensin-aldosterone system: Key agents for treatment. *Pharmacol Res Perspect*, 10(1), e00917. doi: 10.1002/prp2.917
- Lund, B. T., Stone, R., Levy, A. M., Lee, S., Amundson, E., Kashani, N., . . . Kelland, E. E. (2019). Reduced disease severity following therapeutic treatment with angiotensin 1-7 in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*, 127, 87-100. doi: 10.1016/j.nbd.2019.02.018
- Maarouf, A., Boutière, C., Rico, A., Audoin, B., & Pelletier, J. (2018). How much progress has there been in the second-line treatment of multiple sclerosis: A 2017 update. *Rev Neurol (Paris)*, 174(6), 429-440. doi: 10.1016/j.neurol.2018.01.369
- Magalhaes, G. S., Barroso, L. C., Reis, A. C., Rodrigues-Machado, M. G., Gregório, J. F., Motta-Santos, D., . . . Campagnole-Santos, M. J. (2018). Angiotensin-(1-7)

- Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma. *Front Immunol*, 9, 58. doi: 10.3389/fimmu.2018.00058
- Makhani, N., & Tremlett, H. (2021). The multiple sclerosis prodrome. *Nat Rev Neurol*, 17(8), 515-521. doi: 10.1038/s41582-021-00519-3
- Mantero, V., Abate, L., Balgera, R., La Mantia, L., & Salmaggi, A. (2018). Clinical Application of 2017 McDonald Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. *J Clin Neurol*, 14(3), 387-392. doi: 10.3988/jcn.2018.14.3.387
- Margoni, M., Preziosa, P., Filippi, M., & Rocca, M. A. (2022). Anti-CD20 therapies for multiple sclerosis: current status and future perspectives. *J Neurol*, 269(3), 1316-1334. doi: 10.1007/s00415-021-10744-x
- Márquez-Miranda, V., Abrigo, J., Rivera, J. C., Araya-Durán, I., Aravena, J., Simon, F., . . . Cabello-Verrugio, C. (2017). The complex of PAMAM-OH dendrimer with Angiotensin (1-7) prevented the disuse-induced skeletal muscle atrophy in mice. *Int J Nanomedicine*, 12, 1985-1999. doi: 10.2147/ijn.S125521
- Masgrau, R., Guaza, C., Ransohoff, R. M., & Galea, E. (2017). Should We Stop Saying 'Gliosis' and 'Neuroinflammation'? *Trends Mol Med*, 23(6), 486-500. doi: 10.1016/j.molmed.2017.04.005
- Matos, N. L. A., Oliveira Lima, O. S. C., JF, D. A. S., Pin Eros, A. R., Tavares, J. C., Lemos, V. N. S., . . . Klein, A. (2022). Blockade of protease-activated receptor 2 attenuates allergen-mediated acute lung inflammation and leukocyte recruitment in mice. *J Biosci*, 47.
- McClure, R., Yanagisawa, D., Stec, D., Abdollahian, D., Koktysh, D., Xhillari, D., . . . Pham, W. (2015). Inhalable curcumin: offering the potential for translation to imaging and treatment of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 44(1), 283-295. doi: 10.3233/jad-140798
- McNicholas, N., Hutchinson, M., McGuigan, C., & Chataway, J. (2018). 2017 McDonald diagnostic criteria: A review of the evidence. *Mult Scler Relat Disord*, 24, 48-54. doi: 10.1016/j.msard.2018.05.011
- Mecca, A. P., Regenhardt, R. W., O'Connor, T. E., Joseph, J. P., Raizada, M. K., Katovich, M. J., & Summers, C. (2011). Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Exp Physiol*, 96(10), 1084-1096. doi: 10.1113/expphysiol.2011.058578

- Meredith, M. E., Salameh, T. S., & Banks, W. A. (2015). Intranasal Delivery of Proteins and Peptides in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Aaps j*, 17(4), 780-787. doi: 10.1208/s12248-015-9719-7
- Miljković, D., & Spasojević, I. (2013). Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 19(18), 2286-2334. doi: 10.1089/ars.2012.5068
- Milo, R., & Miller, A. (2014). Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*, 13(4-5), 518-524. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.012
- Miyajima, A., Kosaka, T., Kikuchi, E., & Oya, M. (2015). Renin-angiotensin system blockade: Its contribution and controversy. *Int J Urol*, 22(8), 721-730. doi: 10.1111/iju.12827
- Mogi, M., & Horiuchi, M. (2013). Effect of angiotensin II type 2 receptor on stroke, cognitive impairment and neurodegenerative diseases. *Geriatr Gerontol Int*, 13(1), 13-18. doi: 10.1111/j.1447-0594.2012.00900.x
- Montenegro, L., Campisi, A., Sarpietro, M. G., Carbone, C., Acquaviva, R., Raciti, G., & Puglisi, G. (2011). In vitro evaluation of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the brain. *Drug Dev Ind Pharm*, 37(6), 737-746. doi: 10.3109/03639045.2010.539231
- Musielak, E., Feliczk-Guzik, A., & Nowak, I. (2022). Synthesis and Potential Applications of Lipid Nanoparticles in Medicine. *Materials (Basel)*, 15(2). doi: 10.3390/ma15020682
- Nagy, S., Kuhle, J., & Derfuss, T. (2020). Lymphocyte recovery after fingolimod discontinuation in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 7(6). doi: 10.1212/nxi.0000000000000874
- Neher, J. J., Emmrich, J. V., Fricker, M., Mander, P. K., Théry, C., & Brown, G. C. (2013). Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(43), E4098-4107. doi: 10.1073/pnas.1308679110
- Nemen, D., & Lemos-Senna, E. (2011). Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea %J Química Nova. 34, 408-413.

- Ng, H. S., Rosenbult, C. L., & Tremlett, H. (2020). Safety profile of ocrelizumab for the treatment of multiple sclerosis: a systematic review. *Expert Opinion on Drug Safety, 19*(9), 1069-1094. doi: 10.1080/14740338.2020.1807002
- Nie, W., Yan, H., Li, S., Zhang, Y., Yu, F., Zhu, W., . . . Zhu, J. (2009). Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol, 46*(3), 355-361. doi: 10.1016/j.molimm.2008.10.022
- Nosher, S., Fuad, S., Mishra, N., Alrashid, Z. A., Rathod, B., Mohan, D., . . . Heindl, S. E. (2021). Role of Monoclonal Antibody "Alemtuzumab" in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Cureus, 13*(2), e13246. doi: 10.7759/cureus.13246
- Odoardi, F., Sie, C., Streyll, K., Ulaganathan, V. K., Schläger, C., Lodygin, D., . . . Flügel, A. (2012). T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature, 488*(7413), 675-679. doi: 10.1038/nature11337
- Ojha, S., & Kumar, B. (2018). Preparation and Statistical Modeling of Solid Lipid Nanoparticles of Dimethyl Fumarate for Better Management of Multiple Sclerosis. *Adv Pharm Bull, 8*(2), 225-233. doi: 10.15171/apb.2018.027
- Olah, M., Amor, S., Brouwer, N., Vinet, J., Eggen, B., Biber, K., & Boddeke, H. W. (2012). Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia, 60*(2), 306-321. doi: 10.1002/glia.21266
- Oliveira-Lima, O. C., Pinto, M. C., Duchene, J., Qadri, F., Souza, L. L., Alenina, N., . . . Carvalho-Tavares, J. (2015). Mas receptor deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced cerebral and systemic inflammation in mice. *Immunobiology, 220*(12), 1311-1321. doi: 10.1016/j.imbio.2015.07.013
- Onal, H., Ergun, N. U., Arslan, B., Topuz, S., Semerci, S. Y., Ugurel, O. M., . . . Kocatas, A. (2022). Angiotensin (1-7) peptide replacement therapy with plasma transfusion in COVID-19. *Transfus Apher Sci, 103*418. doi: 10.1016/j.transci.2022.103418
- Padda, R. S., Shi, Y., Lo, C. S., Zhang, S. L., & Chan, J. S. (2015). Angiotensin-(1-7): A Novel Peptide to Treat Hypertension and Nephropathy in Diabetes? *J Diabetes Metab, 6*(10). doi: 10.4172/2155-6156.1000615
- Palle, P., Monaghan, K. L., Milne, S. M., & Wan, E. C. K. (2017). Cytokine Signaling in Multiple Sclerosis and Its Therapeutic Applications. *Med Sci (Basel), 5*(4). doi: 10.3390/medsci5040023

- Pandey, P., & Dureja, H. (2018). Recent Patents on Polymeric Nanoparticles for Cancer Therapy. *Recent Pat Nanotechnol*, 12(2), 155-169. doi: 10.2174/1872210512666180327120648
- Pandian, S. R. K., Vijayakumar, K. K., Murugesan, S., & Kunjiappan, S. (2022). Liposomes: An emerging carrier for targeting Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Heliyon*, 8(6), e09575. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09575
- Papadopoulou, A., Derfuss, T., & Sprenger, T. (2017). Daclizumab for the treatment of multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag*, 7(5), 279-297. doi: 10.2217/nmt-2017-0023
- Parodi, B., Rossi, S., Morando, S., Cordano, C., Bragoni, A., Motta, C., . . . Uccelli, A. (2015). Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. *Acta Neuropathol*, 130(2), 279-295. doi: 10.1007/s00401-015-1422-3
- Parodi, B., Sanna, A., Cedola, A., Uccelli, A., & Kerlero de Rosbo, N. (2021). Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2, a Pleiotropically Linked Receptor for the Multiple Sclerosis Drug, Monomethyl Fumarate. Possible Implications for the Inflammatory Response. *Front Immunol*, 12, 655212. doi: 10.3389/fimmu.2021.655212
- Passaglia, P., de Lima Faim, F., Batalhão, M. E., Bendhack, L. M., Antunes-Rodrigues, J., Ulloa, L., . . . Carnio, E. C. (2020). Central angiotensin-(1-7) attenuates systemic inflammation via activation of sympathetic signaling in endotoxemic rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 88, 606-618. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.059>
- Pawlik, M. W., Kwiecien, S., Pajdo, R., Ptak-Belowska, A., Brzozowski, B., Krzysiek-Maczka, G., . . . Brzozowski, T. (2014). Esophagoprotective activity of angiotensin-(1-7) in experimental model of acute reflux esophagitis. Evidence for the role of nitric oxide, sensory nerves, hypoxia-inducible factor-1alpha and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol*, 65(6), 809-822.
- Paz Ocaranza, M., Riquelme, J. A., García, L., Jalil, J. E., Chiong, M., Santos, R. A. S., & Lavandero, S. (2020). Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 17(2), 116-129. doi: 10.1038/s41569-019-0244-8

- Peres, D. S., Theisen, M. C., Fialho, M. F. P., Dalenogare, D. P., Rodrigues, P., Kudsi, S. Q., . . . Trevisan, G. (2021). TRPA1 involvement in depression- and anxiety-like behaviors in a progressive multiple sclerosis model in mice. *Brain Res Bull*, *175*, 1-15. doi: 10.1016/j.brainresbull.2021.07.011
- Phillips, J. T., Selmaj, K., Gold, R., Fox, R. J., Havrdova, E., Giovannoni, G., . . . Meltzer, L. (2015). Clinical Significance of Gastrointestinal and Flushing Events in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Delayed-Release Dimethyl Fumarate. *Int J MS Care*, *17*(5), 236-243. doi: 10.7224/1537-2073.2014-069
- Piehl, F. (2021). Current and emerging disease-modulatory therapies and treatment targets for multiple sclerosis. *J Intern Med*, *289*(6), 771-791. doi: 10.1111/joim.13215
- Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Prijić, I., Jasnić, N., Djordjević, J., & Leposavić, G. (2022). β -Adrenoceptor Blockade Moderates Neuroinflammation in Male and Female EAE Rats and Abrogates Sexual Dimorphisms in the Major Neuroinflammatory Pathways by Being More Efficient in Males. *Cell Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s10571-022-01246-z
- Pinto, B., Pacheco, C., Silva, P., Carvalho-Tavares, J., Sarmiento, B., & Bousbaa, H. (2022). Nanomedicine internalization and penetration: why should we use spheroids? *Scientific Letters*, *1*(1), 3. doi: 10.48797/sl.2022.12
- Pinto, Bárbara F., Ribeiro, Lorena Natasha B., da Silva, Gisela Bevilacqua Rolfsen F., Freitas, Camila S., Kraemer, L., Oliveira, Fabrício Marcus S., . . . Carvalho-Tavares, J. (2022). Inhalation of dimethyl fumarate-encapsulated solid lipid nanoparticles attenuate clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis and pulmonary inflammatory dysfunction in mice. *Clinical Science*, *136*(1), 81-101. doi: 10.1042/CS20210792 %J Clinical Science
- Platten, M., Youssef, S., Hur, E. M., Ho, P. P., Han, M. H., Lanz, T. V., . . . Steinman, L. (2009). Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(35), 14948-14953. doi: 10.1073/pnas.0903958106
- Podbielska, M., O'Keeffe, J., & Hogan, E. L. (2018). Autoimmunity in multiple sclerosis: role of sphingolipids, invariant NKT cells and other immune elements in control of inflammation and neurodegeneration. *J Neurol Sci*, *385*, 198-214. doi: 10.1016/j.jns.2017.12.022

- Possa, M. F., Minacapelli, E., Canale, S., Comi, G., Martinelli, V., & Falautano, M. (2017). The first year after diagnosis: psychological impact on people with multiple sclerosis. *Psychol Health Med*, 22(9), 1063-1071. doi: 10.1080/13548506.2016.1274043
- Pournajaf, S., Dargahi, L., Javan, M., & Pourgholami, M. H. (2022). Molecular Pharmacology and Novel Potential Therapeutic Applications of Fingolimod. *Front Pharmacol*, 13, 807639. doi: 10.3389/fphar.2022.807639
- Prasad, T., Verma, A., & Li, Q. (2014). Expression and cellular localization of the Mas receptor in the adult and developing mouse retina. *Mol Vis*, 20, 1443-1455.
- Preiningerova, J. L., & Vachova, M. (2017). Daclizumab high-yield process in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*, 10(1), 67-75. doi: 10.1177/1756285616671887
- Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292-311. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.053
- Qamar, Z., Qizilbash, F. F., Iqbal, M. K., Ali, A., Narang, J. K., Ali, J., & Baboota, S. (2019). Nano-Based Drug Delivery System: Recent Strategies for the Treatment of Ocular Disease and Future Perspective. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 13(4), 246-254. doi: 10.2174/1872211314666191224115211
- Quirant-Sánchez, B., Mansilla, M. J., Navarro-Barriuso, J., Presas-Rodríguez, S., Teniente-Serra, A., Fondelli, F., . . . Martínez-Cáceres, E. (2021). Combined Therapy of Vitamin D3-Tolerogenic Dendritic Cells and Interferon- β in a Preclinical Model of Multiple Sclerosis. *Biomedicines*, 9(12). doi: 10.3390/biomedicines9121758
- Rago, F., Melo, E. M., Kraemer, L., Galvão, I., Cassali, G. D., Santos, R. A. S., . . . Teixeira, M. M. (2019). Effect of preventive or therapeutic treatment with angiotensin 1-7 in a model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Leukoc Biol*, 106(3), 677-686. doi: 10.1002/jlb.Ma1218-490rr
- Rammohan, K., Coyle, P. K., Sylvester, E., Galazka, A., Dangond, F., Grosso, M., & Leist, T. P. (2020). The Development of Cladribine Tablets for the Treatment of Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Drugs*, 80(18), 1901-1928. doi: 10.1007/s40265-020-01422-9
- Regenhardt, R. W., Mecca, A. P., Desland, F., Ritucci-Chinni, P. F., Ludin, J. A., Greenstein, D., . . . Sumners, C. (2014). Centrally administered angiotensin-(1-

- 7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol*, 99(2), 442-453. doi: 10.1113/expphysiol.2013.075242
- Ren, S., Han, S., Wang, L., Huang, Y., Wu, J., & Wu, G. (2022). Minimally Invasive Surgery for ICH Evacuation Combined With Deferoxamine Treatment Increased Perihematomal Claudin-5 and ZO-1 Expression Levels and Decreased BBB Permeability in Rabbits. *Front Neurol*, 13, 835494. doi: 10.3389/fneur.2022.835494
- Rivas-Santisteban, R., Lillo, J., Muñoz, A., Rodríguez-Pérez, A. I., Labandeira-García, J. L., Navarro, G., & Franco, R. (2021). Novel Interactions Involving the Mas Receptor Show Potential of the Renin-Angiotensin system in the Regulation of Microglia Activation: Altered Expression in Parkinsonism and Dyskinesia. *Neurotherapeutics*, 18(2), 998-1016. doi: 10.1007/s13311-020-00986-4
- Robinson, A. P., Harp, C. T., Noronha, A., & Miller, S. D. (2014). The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol*, 122, 173-189. doi: 10.1016/b978-0-444-52001-2.00008-x
- Rommer, P. S., Milo, R., Han, M. H., Satyanarayan, S., Sellner, J., Hauer, L., . . . Stuve, O. (2019). Immunological Aspects of Approved MS Therapeutics. *Front Immunol*, 10, 1564. doi: 10.3389/fimmu.2019.01564
- Rommer, P. S., & Zettl, U. K. (2018). Managing the side effects of multiple sclerosis therapy: pharmacotherapy options for patients. *Expert Opin Pharmacother*, 19(5), 483-498. doi: 10.1080/14656566.2018.1446944
- Russo, R. C., Savino, B., Mirolo, M., Buracchi, C., Germano, G., Anselmo, A., . . . Teixeira, M. M. (2018). The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2(+) and CCR5(+) IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 314(6), L1010-L1025. doi: 10.1152/ajplung.00233.2017
- Saavedra, J. M. (2016). Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*, 36(2), 259-279. doi: 10.1007/s10571-015-0327-y
- Sambucci, M., Gargano, F., De Rosa, V., De Bardi, M., Picozza, M., Placido, R., . . . Borsellino, G. (2018). FoxP3 isoforms and PD-1 expression by T regulatory cells in multiple sclerosis. *Sci Rep*, 8(1), 3674. doi: 10.1038/s41598-018-21861-5

- Samjoo, I. A., Worthington, E., Drudge, C., Zhao, M., Cameron, C., Häring, D. A., . . . Adlard, N. (2021). Efficacy classification of modern therapies in multiple sclerosis. *J Comp Eff Res*, *10*(6), 495-507. doi: 10.2217/cer-2020-0267
- Samus, M., Seelige, R., Schäfer, K., Sorokin, L., & Vestweber, D. (2018). CD99L2 deficiency inhibits leukocyte entry into the central nervous system and ameliorates neuroinflammation. *J Leukoc Biol*, *104*(4), 787-797. doi: 10.1002/jlb.1a0617-228r
- Saria, A., & Lundberg, J. M. (1983). Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods*, *8*(1), 41-49. doi: 10.1016/0165-0270(83)90050-x
- Schere-Levy, C., Suberbordes, M., Ferri, D. M., Ayre, M., Gattelli, A., Kordon, E. C., . . . Walther, T. (2022). Treatment with Angiotensin-(1-7) Prevents Development of Oral Papilloma Induced in K-ras Transgenic Mice. *Int J Mol Sci*, *23*(7). doi: 10.3390/ijms23073642
- Schwenkenbecher, P., Wurster, U., Konen, F. F., Gingele, S., Sühs, K. W., Wattjes, M. P., . . . Skripuletz, T. (2019). Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Front Neurol*, *10*, 188. doi: 10.3389/fneur.2019.00188
- Scioli Montoto, S., Muraca, G., & Ruiz, M. E. (2020). Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. [Review]. *7*. doi: 10.3389/fmolb.2020.587997
- Seery, N., Sharmin, S., Li, V., Nguyen, A. L., Meaton, C., Atvars, R., . . . Monif, M. (2021). Predicting Infection Risk in Multiple Sclerosis Patients Treated with Ocrelizumab: A Retrospective Cohort Study. *CNS Drugs*, *35*(8), 907-918. doi: 10.1007/s40263-021-00810-3
- Sellner, J., & Rommer, P. S. (2020). Immunological consequences of "immune reconstitution therapy" in multiple sclerosis: A systematic review. *Autoimmun Rev*, *19*(4), 102492. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102492
- Shenoy, V., Kwon, K. C., Rathinasabapathy, A., Lin, S., Jin, G., Song, C., . . . Raizada, M. K. (2014). Oral delivery of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-(1-7) bioencapsulated in plant cells attenuates pulmonary hypertension. *Hypertension*, *64*(6), 1248-1259. doi: 10.1161/hypertensionaha.114.03871

- Shevyrev, D., & Tereshchenko, V. (2019). Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol*, *10*, 3100. doi: 10.3389/fimmu.2019.03100
- Shobo, A., Pamreddy, A., Kruger, H. G., Makatini, M. M., Naicker, T., Govender, T., & Baijnath, S. (2018). Enhanced brain penetration of pretomanid by intranasal administration of an oil-in-water nanoemulsion. *Nanomedicine (Lond)*, *13*(9), 997-1008. doi: 10.2217/nnm-2017-0365
- Simões e Silva, A. C., Silveira, K. D., Ferreira, A. J., & Teixeira, M. M. (2013). ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol*, *169*(3), 477-492. doi: 10.1111/bph.12159
- Soelberg Sorensen, P. (2017). Safety concerns and risk management of multiple sclerosis therapies. *Acta Neurol Scand*, *136*(3), 168-186. doi: 10.1111/ane.12712
- Song, Z., Khaw, Y. M., Pacheco, L. A., Tseng, K. Y., Tan, Z., Cai, K., . . . Inoue, M. (2020). Induction of a higher-ordered architecture in glatiramer acetate improves its biological efficiency in an animal model of multiple sclerosis. *Biomater Sci*, *8*(19), 5271-5281. doi: 10.1039/d0bm00957a
- Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsoy, M., & Coffman, T. M. (2014). Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*, *4*(3), 1201-1228. doi: 10.1002/cphy.c130040
- Stone, R. E., Liu, S., Levy, A. M., Kashani, N., Louie, S. G., Rodgers, K. E., . . . Lund, B. T. (2020). Activation of the Protective Arm of the Renin Angiotensin System in Demyelinating Disease. *J Neuroimmune Pharmacol*, *15*(2), 249-263. doi: 10.1007/s11481-019-09894-7
- Sureshkumar, K. K., & Chopra, B. (2019). Does Induction Type Influence Outcomes in Kidney Transplant Recipients at Different Phases of Hepatitis B Infection? *Exp Clin Transplant*, *17*(4), 457-460. doi: 10.6002/ect.2017.0286
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological reviews*, *99*(1), 21-78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017
- t Hart, B. A., Luchicchi, A., Schenk, G. J., Stys, P. K., & Geurts, J. J. G. (2021). Mechanistic underpinning of an inside-out concept for autoimmunity in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*, *8*(8), 1709-1719. doi: 10.1002/acn3.51401

- Tabansky, I., Messina, M. D., Bangeranye, C., Goldstein, J., Blitz-Shabbir, K. M., Machado, S., . . . Stern, J. N. (2015). Advancing drug delivery systems for the treatment of multiple sclerosis. *Immunol Res*, *63*(1-3), 58-69. doi: 10.1007/s12026-015-8719-0
- Takemiya, T., & Takeuchi, C. (2013). Traveled Distance Is a Sensitive and Accurate Marker of Motor Dysfunction in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *ISRN Neuroscience*, *2013*, 170316. doi: 10.1155/2013/170316
- Talanki Manjunatha, R., Habib, S., Sangaraju, S. L., Yopez, D., & Grandes, X. A. (2022). Multiple Sclerosis: Therapeutic Strategies on the Horizon. *Cureus*, *14*(5), e24895. doi: 10.7759/cureus.24895
- Tapeinos, C., Battaglini, M., & Ciofani, G. (2017). Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *J Control Release*, *264*, 306-332. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.08.033
- Tarlinton, R. E., Martynova, E., Rizvanov, A. A., Khaiboullina, S., & Verma, S. (2020). Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Viruses*, *12*(6). doi: 10.3390/v12060643
- Tavares, L. P., Garcia, C. C., Vago, J. P., Queiroz-Junior, C. M., Galvão, I., David, B. A., . . . Sousa, L. P. (2016). Inhibition of Phosphodiesterase-4 during Pneumococcal Pneumonia Reduces Inflammation and Lung Injury in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *55*(1), 24-34. doi: 10.1165/rcmb.2015-0083OC
- Thati, S., Kuehl, C., Hartwell, B., Sestak, J., Siahaan, T., Forrest, M. L., & Berkland, C. (2015). Routes of administration and dose optimization of soluble antigen arrays in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharm Sci*, *104*(2), 714-721. doi: 10.1002/jps.24272
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *Lancet*, *391*(10130), 1622-1636. doi: 10.1016/s0140-6736(18)30481-1
- Tillery, E. E., Clements, J. N., & Howard, Z. (2017). What's new in multiple sclerosis? *Ment Health Clin*, *7*(5), 213-220. doi: 10.9740/mhc.2017.09.213
- Torkildsen, Ø., Myhr, K. M., & Bø, L. (2016). Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *Eur J Neurol*, *23 Suppl 1*(Suppl 1), 18-27. doi: 10.1111/ene.12883

- Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Takahashi, Y., . . . Ishihara, T. (2019). Behavioural effects of inhalation exposure to dizocilpine (MK-801) in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *117*, 109038. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109038>
- Vaajanen, A., Kalesnykas, G., Vapaatalo, H., & Uusitalo, H. (2015). The expression of Mas-receptor of the renin-angiotensin system in the human eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, *253*(7), 1053-1059. doi: 10.1007/s00417-015-2952-z
- Vakilinezhad, M. A., Amini, A., Akbari Javar, H., Baha'addini Beigi Zarandi, B. F., Montaseri, H., & Dinarvand, R. (2018). Nicotinamide loaded functionalized solid lipid nanoparticles improves cognition in Alzheimer's disease animal model by reducing Tau hyperphosphorylation. *Daru*, *26*(2), 165-177. doi: 10.1007/s40199-018-0221-5
- Vermersch, P., Oh, J., Cascione, M., Oreja-Guevara, C., Gobbi, C., Travis, L. H., . . . Coyle, P. K. (2020). Teriflunomide vs injectable disease modifying therapies for relapsing forms of MS. *Mult Scler Relat Disord*, *43*, 102158. doi: 10.1016/j.msard.2020.102158
- Vijitha, N., & Engel, D. R. (2019). Remote control of T(h) 17 responses: The lung-CNS axis during EAE. *J Leukoc Biol*, *105*(5), 827-828. doi: 10.1002/jlb.1ce0219-072r
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., . . . Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*, *26*(14), 1816-1821. doi: 10.1177/1352458520970841
- Wang, J., Wang, J., Wang, J., Yang, B., Weng, Q., & He, Q. (2019). Targeting Microglia and Macrophages: A Potential Treatment Strategy for Multiple Sclerosis. *Front Pharmacol*, *10*, 286. doi: 10.3389/fphar.2019.00286
- Wang, Z., Kawabori, M., & Houkin, K. (2020). FTY720 (Fingolimod) Ameliorates Brain Injury through Multiple Mechanisms and is a Strong Candidate for Stroke Treatment. *Curr Med Chem*, *27*(18), 2979-2993. doi: 10.2174/0929867326666190308133732
- Wei, Y., Wang, T., Liao, L., Fan, X., Chang, L., & Hashimoto, K. (2022). Brain-spleen axis in health and diseases: A review and future perspective. *Brain Res Bull*, *182*, 130-140. doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.02.008

- Wildner, P., Stasiołek, M., & Matysiak, M. (2020). Differential diagnosis of multiple sclerosis and other inflammatory CNS diseases. *Mult Scler Relat Disord*, *37*, 101452. doi: 10.1016/j.msard.2019.101452
- Wu, J., Zhao, D., Wu, S., & Wang, D. (2015). Ang-(1-7) exerts protective role in blood-brain barrier damage by the balance of TIMP-1/MMP-9. *Eur J Pharmacol*, *748*, 30-36. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.12.007
- Xiong, Y., Wu, X., Qu, X., Xie, X., & Ren, Y. (2018). Functions of T-cell subsets and their related cytokines in the pathological processes of autoimmune encephalomyelitic mice. *International journal of clinical and experimental pathology*, *11*(10), 4817-4826.
- Yamout, B. I., & Alroughani, R. (2018). Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*, *38*(2), 212-225. doi: 10.1055/s-0038-1649502
- Zaidan, I., Tavares, L. P., Sugimoto, M. A., Lima, K. M., Negreiros-Lima, G. L., Teixeira, L. C., . . . Sousa, L. P. (2022). Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis. *JCI Insight*, *7*(1). doi: 10.1172/jci.insight.147819
- Zambelli, V., Bellani, G., Borsa, R., Pozzi, F., Grassi, A., Scanziani, M., . . . Pesenti, A. (2015). Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Intensive Care Med Exp*, *3*(1), 44. doi: 10.1186/s40635-015-0044-3
- Zandee, S. E. J., O'Connor, R. A., Mair, I., Leech, M. D., Williams, A., & Anderton, S. M. (2017). IL-10-producing, ST2-expressing Foxp3(+) T cells in multiple sclerosis brain lesions. *Immunol Cell Biol*, *95*(5), 484-490. doi: 10.1038/icb.2017.3
- Zhu, D., Sun, M., Liu, Q., Yue, Y., Lu, J., Lin, X., & Shi, J. (2020). Angiotensin (1-7) through modulation of the NMDAR-nNOS-NO pathway and serotonergic metabolism exerts an anxiolytic-like effect in rats. *Behav Brain Res*, *390*, 112671. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112671
- Ziaja, M., Urbanek, K. A., Kowalska, K., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2021). Angiotensin II and Angiotensin Receptors 1 and 2—Multifunctional System in Cells Biology, What Do We Know? , *10*(2), 381.

- Zielińska, A., Ferreira, N. R., Durazzo, A., Lucarini, M., Cicero, N., Mamouni, S. E., . . . Souto, E. B. (2019). Development and Optimization of Alpha-Pinene-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Using Experimental Factorial Design and Dispersion Analysis. *Molecules*, *24*(15). doi: 10.3390/molecules24152683
- Zinger, N., Ponath, G., Sweeney, E., Nguyen, T. D., Lo, C. H., Diaz, I., . . . Gauthier, S. A. (2022). Dimethyl Fumarate Reduces Inflammation in Chronic Active Multiple Sclerosis Lesions. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, *9*(2). doi: 10.1212/nxi.0000000000001138

6. ANEXO A: ARTIGO PUBLICADO “INHALATION OF DIMETHYL FUMARATE-ENCAPSULATED SOLID LIPID NANOPARTICLES ATTENUATE CLINICAL SIGNS OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS AND PULMONARY INFLAMMATORY DYSFUNCTION IN MICE”
-

Research Article

Inhalation of dimethyl fumarate-encapsulated solid lipid nanoparticles attenuate clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis and pulmonary inflammatory dysfunction in mice

Bárbara Fernandes Pinto¹, Lorena Natasha Brito Ribeiro¹, Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira da Silva^{2,3}, Camila Simões Freitas⁴, Lucas Kraemer^{4,5}, Fabrício Marcus Silva Oliveira⁵, Marianna Carvalho Clímaco⁵, Flávio Afonso Gonçalves Mourão^{1,6}, Gabryella Soares Pinheiro dos Santos⁷, Samantha Ribeiro Béla⁷, Isabella Luísa da Silva Gurgel⁸, Fábio de Lima Leite², Anselmo Gomes de Oliveira³, Maura Regina Silva da Páscoa Vilela¹, Onésia Cristina Oliveira-Lima⁹, Frederico Marianetti Soriani⁸, Ricardo Toshio Fujiwara⁵, Alexander Birbrair^{7,*}, Remo Castro Russo^{4,*} and Juliana Carvalho-Tavares^{1,*}

¹Neuroscience Group, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; ²Nanoneurobiophysics Research Group, Department of Physics, Chemistry and Mathematics, Federal University of São Carlos (UFSCAR), Sorocaba, São Paulo, Brazil; ³State of São Paulo University (UNESP), Drugs and Medicines Department, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil; ⁴Laboratory of Pulmonary Immunology and Mechanics, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁵Laboratory of Immunology and Genomics of Parasites, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁶Center for Technology and Research in Magneto-Resonance (CTPMAG), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁷Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁸Laboratory of Functional Genetics, Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁹Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brazil

Correspondence: Juliana Carvalho-Tavares (julianact2015@gmail.com) or Alexander Birbrair (alexbirb@gmail.com)

Rationale: The FDA-approved Dimethyl Fumarate (DMF) as an oral drug for Multiple Sclerosis (MS) treatment based on its immunomodulatory activities. However, it also caused severe adverse effects mainly related to the gastrointestinal system. **Objective:** Investigated the potential effects of solid lipid nanoparticles (SLNs) containing DMF, administered by inhalation on the clinical signs, central nervous system (CNS) inflammatory response, and lung function changes in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Materials and methods:** EAE was induced using MOG_{35–55} peptide in female C57BL/6J mice and the mice were treated via inhalation with DMF-encapsulated SLN (CTRL/SLN/DMF and EAE/SLN/DMF), empty SLN (CTRL/SLN and EAE/SLN), or saline solution (CTRL/saline and EAE/saline), every 72 h during 21 days. **Results:** After 21 days post-induction, EAE mice treated with DMF-loaded SLN, when compared with EAE/saline and EAE/SLN, showed decreased clinical score and weight loss, reduction in brain and spinal cord injury and inflammation, also related to the increased influx of Foxp3⁺ cells into the spinal cord and lung tissues. Moreover, our data revealed that EAE mice showed signs of respiratory disease, marked by increased vascular permeability, leukocyte influx, production of TNF- α and IL-17, perivascular and peribronchial inflammation, with pulmonary mechanical dysfunction associated with loss of respiratory volumes and elasticity, which DMF-encapsulated reverted in SLN nebulization. **Conclusion:** Our study suggests that inhalation of DMF-encapsulated SLN is an effective therapeutic protocol that reduces not only the CNS inflammatory process and disability progression, characteristic of EAE disease, but also protects mice from lung inflammation and pulmonary dysfunction.

*These authors contributed equally to this work.

Received: 07 September 2021
Revised: 09 December 2021
Accepted: 14 December 2021

Version of Record published:
07 January 2022

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, disabling autoimmune disease of the central nervous system (CNS) that affects approximately 2.5 million people worldwide. MS is characterized by auto-inflammatory response associated with gliosis, demyelination, and neuroaxonal degeneration in the CNS [1–3]. According to the International Multiple Sclerosis Federation, the overall mean prevalence of the disease increased from 30/100000 in 2008 to 33/100000 in 2013 [4]. Different symptoms are associated with MS, depending on which substrates of the nervous system are affected. MS has no cure, however, there are a wide variety of immunomodulatory drugs, which have been licensed to treat MS patients. Currently, the main drugs used have anti-inflammatory characteristics such as interferon- β , glatiramer acetate, teriflunomide, fingolimod, natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone and dimethyl fumarate (DMF) [5], controlling the autoimmune events related to MS.

DMF is an FDA-approved drug that has been used in the treatment of autoimmune diseases such as psoriasis and MS [6]. DMF had been the first line of oral therapy introduced to treat the MS [7–9]. Experimental studies revealed that abundant esterases in the gastrointestinal tract rapidly metabolize orally ingested DMF into its primary active metabolite monomethyl fumarate (MMF) [10], and present a short half-life of \sim 12 min into the body [11]. According to Al-Khamis (2016), the most common adverse effects are cough or hoarseness, heat sensation, fever or chills, and pain [12]. In addition, the main adverse effects caused by the drug are related to the gastrointestinal system, such as upper abdominal pain, nausea and diarrhea, hypovitaminosis D, gastrointestinal and hepatic hypersensitivity, vomiting, and dyspepsia [12]. The side effects caused by oral administration contributed to the treatment discontinuation [13,14], as shown by two randomized clinical trials: *Determination of the Efficacy and Safety of Oral Fumarate in Relapsing-Remitting MS* [DEFINE] [15] and *Comparator and an Oral Fumarate in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis* [CONFIRM] [16], respectively; 16 and 12% of the population discontinued DMF treatment due to its adverse effects.

Solid lipid nanoparticles (SLNs) are safe drug delivery systems that allow a drug-controlled release [17] and are excellent to incorporate lipophilic drug [18]. Thus, considering all adverse effects of oral administration of DMF in MS, and since the encapsulated drug avoids rapid metabolism and increase therapeutic effectiveness, we hypothesized that an alternative route of the drug administration, such as inhalation of SLN-encapsulated DMF, could prevent the adverse effects caused by the oral route, while successfully delivering the drug into the CNS [18,19]. To test this, SLN containing DMF were airway administered in mice submitted to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) through inhalatory route using a nebulizer. Our results revealed that the treatment with inhaled SLN-encapsulated DMF did not cause morphological, mechanical, or immune changes in lungs of control mice nebulized with SLN-encapsulated DMF, showing no apparent side effect through this administration route. In the context of CNS disease, inhalation of SLN-encapsulated DMF was able to reduce the clinical manifestations of motor dysfunction and CNS inflammation, also attenuating the pulmonary inflammation and dysfunction after 21 days in EAE treated mice compared with the EAE control group. Finally, low grade of inflammation in SLN-encapsulated DMF treated mice may be due to increased influx of Foxp3⁺ cells in the spinal cord and lung tissue, protecting mice from EAE and related lung inflammatory manifestations. Therefore, SLN-encapsulated DMF inhalation could be an alternative and safe route of drug administration in the context of MS.

Materials and methods

Mice and experimental design

Female mice C57Bl/6J, aged between 7 and 8 weeks, were supplied by the CEBIO-ICB/UFGM vivarium. The transgenic mice Foxp3 GFP⁺ were kindly donated by Dr Ana Maria Caetano Faria (Department of Biochemistry and Immunology/UFGM). The mice were housed in a pathogen-free animal facility of the Department of Physiology and Biophysics, under standard environmental conditions with 12-h light–dark cycle, temperature-controlled ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and fed and provided with water *ad libitum*. Efforts were made to avoid any unnecessary distress to the mice, in accordance with NIH guidelines for animal care and use. All animal care and experimental procedures were approved by the Ethics Animal Care and Use Committee (CEUA—UFGM; protocol number 82/2017), following the Guide for the Care and Use of Laboratory Mice from the Federal University of Minas Gerais.

After reaching 20 g and 12 weeks of age, the mice were randomly divided into six groups: control + saline (CTRL/saline); control group + empty SLN (CTRL/SLN); control + SLN + DMF (CTRL/SLN/DMF); EAE+ saline group (EAE/saline); EAE + empty SLN (EAE/SLN); and EAE + SLN + DMF (EAE/SLN/DMF). The mice received the respective treatments every 72 h for 21 days. Several studies have evidenced that the MS neurological damage initiates before the symptom's appearance. In addition, nowadays, many patients are diagnosed early, before the onset of motor disorders. Thus, early treatment is essential to reduce neurological impairment [20,21]. Thereby, in order

to try to mimic this reality, the treatment of the mice started on the day of EAE induction, as is also done in other previous studies [22,23].

The DMF-treated groups were submitted to a drug-associated saline solution aerosolization through a nebulizer inhaler (Soniclear/Minisonic, SP, Brazil) for 15 min. The solution containing 0.3 ml of SNL + DMF (6.0 mg) at 0.7 ml of saline 0.9%, (6.0 mg/ml/animal) was administered in CTRL/SLN/DMF and EAE/SLN/DMF groups. At the same time, the CTRL/SLN and EAEA/SLN groups received 0.3 ml of empty SLN solution at 0.7 mL of saline 0.9%. For the CTRL/saline and EAE/saline groups, 1.0 ml of saline 0.9% was administered to each mice in the nebulized form at the same time period. A previous study showed that C57BL/6J mice received 100 mg/kg/day of DMF orally [23]. To follow this standardization, and considering that in our experimental design, the mice were treated with a dose of 6 mg/ml/animal every 72 h. The drug solution volumes were 0.3 ml as previously described [24]. However, due to the solution viscosity, to facilitate the nebulization process, 0.7 ml of 0.9% saline solution was added to each dose, corresponding to 6.0 mg/ml/animal as mentioned above.

SLN preparation

Hydrogenated soy phosphatidylcholine—Epikuron 200 SH[®], CAS number 92128-87-5 was purchased from Lucas Meyer (Germany). Glyceryl monostearate, CAS number 31566-31-1 was purchased from Synth (Brazil). Poloxamer 188, CAS number 9003-11-6 and DMF, CAS number 624-49-7) were purchased from Sigma–Aldrich (U.S.A.). Water was purified from Millipore Milli Q Integral 3 Water Purification System, Millipore Corporation (U.S.A.), and its resistivity was 18.2 M Ω -cm.

The SLNs were prepared using aqueous phase, lipid phase, and surfactants. The aqueous phase containing the poloxamer 188 and the lipid phase containing glyceryl monostearate, hydrogenated soy phosphatidylcholine, and DMF were separately heated at approximately 60°C and mixed homogeneously. Then, they were emulsified using a 600-W ultrasonic tip stirrer for 15 min in a discontinuous mode (1 min of sonication with 1-min interval) and cooled in an ice bath to harden the lipid cores. The production was carried out batch-by-batch and stored at refrigerated temperature (7–8°C) until administration. Previous experiments demonstrated the physical and chemical stability for longer than the storage period before administration to animals (unpublished results).

Dynamic light-scattering and polydispersity

The droplet size and polydispersity analysis were performed with a dynamic light-scattering (DLS) Zetasizer Nano system ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.), with He–Ne 4 mW laser source at 633 nm using a recording angle of 173°. For analyses, the samples were diluted ten-fold with Milli-Q purified water. The results represent the mean \pm standard deviation of at least ten determinations. The analyses were carried out at 25 \pm 0.2°C.

Zeta potential

The zeta potential was determined with a Zetasizer Nano system ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). The samples were diluted with Milli-Q purified water. The results represent the mean \pm standard deviation of at least ten determinations. The analyses were carried out at 25 \pm 0.2°C.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (EVOMA15, Zeiss) evaluated the shape and surface morphology of SLN. The samples were freeze-dried and mounted on double-sided tape that was previously secured to an aluminum bracket, and vacuum-gold plated using a Sputter Coater SCD 050 Bal-Tec equipment. For samples analysis, an accelerating voltage of 2-kV, 50000 \times magnification, and argon atmosphere were used.

X-ray diffraction

The formulation crystalline structure was analyzed by powder X-ray diffraction (XRD). The data were collected on a Siemens (Munich, Germany) D-500 diffractometer (Cu K α radiation, λ = 1.541 Å) with a curved graphite monochromator, by using the step-counting method (step 0.05° and time 0.1 s) in a 2 θ range between 4° and 70°.

EAE induction protocol

Active EAE model was induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein 35–55 (MOG_{35–55}) as previously described [25–28]. Briefly, 12-week-old female C57BL/6J mice were initially weighed and received *s.c.* administration of an emulsion containing 100 μ g of murine peptide MOG_{35–55} (sequence: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (PRO-TEIMAX, SP, Brazil) diluted in 50 μ l of saline and 50 μ l of Freund's Complete Adjuvant (CFA) and supplemented with

4.0 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.). After this procedure, the mice received two intraperitoneal (*i.p.*) injections with pertussis toxin (300 ng) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) diluted in 200 μ l saline, 48 h apart. The control groups received injections containing saline (0.9%) in the same anatomical sites in order to mimic the stress suffered by the EAE groups during the induction of the experimental model.

Evaluation of EAE clinical evolution

Mice were monitored daily for body weight and clinical disease, as previously described [29]. The clinical signs were scored as follows: (0) no clinical signs; (1) tail paresis; (2) tail paralysis; (3) paresis of hindlimbs, uncoordinated movement; (4) paralysis of a hind leg; (5) paralysis of both hind legs; (6) paralysis of the hind legs and paresis of the anterior ones; (7) paralysis of the hind legs and a paralyzed anterior paw; (8) paralysis of the hind and anterior legs; (9) dying; and (10) death [30].

Vascular permeability

To evaluate the blood plasma leakage through gaps produced in the endothelium of post-capillary venules in the organs, a modified protocol based on the Evans Blue (Dinâmica, SP, Brazil) dye was used as a marker of vascular albumin extravasation, as previously described [31]. First, mice were anesthetized intraperitoneally with a mixture of ketamine (60 mg/kg, Laboratório Cristália, SP, Brazil) and xylazine (10 mg/kg, Rompun[®], Bayer). Then 200 μ l of Evans Blue (2%) was administered intravenously into the retro-orbital plexus. At the end of 1 h, transcardiac perfusion with saline solution (0.9%) was performed to ensure that all dye traces were removed from tissues vascularity. Brains, spinal cords, lungs, and spleens were removed and placed on a Petri dish for 48 h at 40°C. After the drying period, samples were weighed, homogenized, and stored in Eppendorf's containing 1 ml of formamide, remaining in this solution for another 48 h at room temperature. The dye extracted was quantified in a spectrophotometer (620 nm), and the concentration was determined through the standard curve with the following concentrations 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625, and 0.3125 μ g/ml of Evans Blue.

Spinal cord intravital microscopy

The intravital microscopy was performed on the 21st day post-induction (d.p.i.), by exposing the spinal cord microcirculation through laminectomy. Intravital microscopy was performed on spinal cord microvasculature of the EAE and control mice at 21 d.p.i. as previously described [32,33]. Briefly, mice from each group were anesthetized using an *i.p.* injection of a mixture of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). To observe leukocyte–endothelial interactions, circulating leukocytes were fluorescently labeled by retro-orbital plexus administration of Rhodamine 6G dye (200 μ l, 0.3 mg/kg) (Sigma, SP, Brazil). Rhodamine 6G is a fluorochrome that provides selective labeling of leukocyte and platelet mitochondria. A midline skin incision measuring 2–3 cm was performed, and detachment of the paravertebral musculature and laminectomy were performed at the level of the thoracic vertebrae to create a spinal imaging window measuring 0.5–1.0 cm in length. After the surgery, the mice were transferred to the microscope stage and were maintained at 37°C using a heating pad (Fine Science Tools Inc., Canada).

To assess the leukocyte–endothelium interactions in the spinal cord microcirculation, the fluorescent leukocytes were visualized under a Zeiss Imager M.2 (20 \times long-distance objective lens; Göttingen, Germany) equipped with a fluorescent light source (epi-illumination at 510–560 nm, using a 590-nm emission filter) [25]. Rolling cells were defined as cells that rolled at speed slower than that of blood flow. Cells were considered to be adherent when they remained stationary for at least 20 s. After analysis, mice were killed by decapitation following intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) according to approval by the Institutional Animal Care and Use Committees at the Federal University of Minas Gerais, as previously reported [34–36].

Spinal cord and lung histological analysis

Mice were perfused intracardially using 10% formalin in PBS, and the tissues (spinal cord and lung) were maintained in the fixative until they were prepared for paraffin embedding. Spinal cords were sectioned transversely, and the thoracic-lumbar level was analyzed (the same region used for intravital microscopy). Serial spinal cord and lung sections (4 μ m) were cut and were stained using Hematoxylin and Eosin (H&E). The slides were photographed using the Olympus BX51 microscope (20 \times objective) equipped with Image-Pro Express 4.0 software (Media Cybernetics, MD, U.S.A.).

Quantitative analysis of cellularity was performed by the KS300 program (Zeiss, Jena, Germany) from the Morphometry Laboratory (Department of General Pathology/ICB/UFMG). The result was expressed by the number of cell nuclei per stained analyzed area (μm).

Histological analysis of the lung was performed under a light-field optical microscope coupled to a digital image capture system (Motic 2.0). For the airway inflammation score, perivascular inflammation, parenchymal inflammation and hemorrhage, 20 random images were captured per mice with a 20 \times magnification. The score was based on the methodology previously described [37,38].

ELISA

Brain and lung cytokine levels (TNF- α , IL-17, and IL-10) were quantified by ELISA at 21 d.p.i. Briefly, the mice were anesthetized with a mixture of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and the brains and lungs were collected and properly stored in liquid nitrogen. The tissues were homogenized in an ice-cold extraction solution (0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KI units aprotinin) [26,28,39] at the rate of 1 ml per 100 mg of tissue, for 30–40 s per sample. The homogenates were centrifuged at 10000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was collected, aliquoted, and stored at -80°C until use. The samples were kept cold on ice throughout the procedure. ELISA kits for the determination of TNF- α , IL-17, and IL-10 cytokines were obtained from R&D Systems (Minneapolis, U.S.A.). The plates were read using a plate reader at 492 nm (Thermo Plate reader). The concentration for each sample was calculated from the corresponding standard curve. The minimum detectable concentration for each molecule evaluated was: IL-17: 15.62 pg/ml, IL-10: 31.25 pg/ml, and TNF- α : 31.25 pg/ml.

Immunofluorescence and qualifying analysis of lungs and spinal cord Foxp3⁺ cells

For the quantitative analysis of Foxp3⁺ cell profile, the Foxp3 GFP⁺ tissues were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS, incubated overnight at 4°C with 30% sucrose in PBS, embedded in optimal cutting temperature compound (OCT, Tissue-Tek). The embedded tissues were stored at -80°C . Sections were stained with PBS containing DAPI (1:1000) for 5 min. The tissues were washed with PBS and mounted using Dako fluorescence mounting medium (Dako, Santa Clara, CA). Stained sections were imaged with a 40 \times objective under a confocal microscope (Zeiss Imager M.2) coupled to a digital image capture system (Motic 2.0) and the JVC TK-1270/RGB microcamera JVC TK-1270/RGB (JVC, Tokyo, Japan) [40].

The counting of Foxp3⁺ cells present in the lung was performed using 20 digitalized images of iBALT and the perivascular region per animal. Subsequently, for statistical analysis, the mean number of Foxp3⁺ cells found per animal was obtained. To quantify Foxp3⁺ cells present in the spinal cord, the left region of the central spinal cord was considered, and ten images per animal were digitized. The reduced number of digitized images was due to the reduction in the area of our interest. Thus, as in the lung, the mean of Foxp3⁺ cells per animal was used for statistical purposes.

Bronchoalveolar lavage analysis

Bronchoalveolar lavage was performed to obtain leukocytes present in the alveolar space. On the 21st day after induction, all experimental groups were anesthetized intraperitoneally with a mixture of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and the trachea of each animal was exposed and cannulated with a 1.7-mm polypropylene catheter. Washing was done by injecting 1 ml aliquots of sterile PBS, injected and collected three times each, obtaining 1.7–2.0 ml of final volume recovered from the wash. At the end of the experiment, mice were decapitated after intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).

The collected wash liquid was centrifuged in 5-ml tubes at 4°C for 5 min at a speed of 1500 rpm, forming a cell pellet used for total and differential cell count. The cell pellet was resuspended in 100 μl of 3% BSA diluted in PBS, and the total number of leukocytes was determined by counting the cells stained with Turk's solution in Neubauer's chambers. Total counts were made on optical microscopes with a 40 \times objective. For the differential count, the slides were prepared by cytospin (Cytospin 3, Shandon) and stained with May–Grunwald–Giemsa, as previously described [37,38]. The differential counts were performed in optical microscopes with a 100 \times objective using immersion oil.

Assessment of respiratory mechanic dysfunction

Mice were anesthetized with a subcutaneous injection of ketamine and xylazine (8.5 mg/kg xylazine and 130 mg/kg ketamine) to maintain spontaneous breathing under anesthesia. Mice were tracheostomized, placed in a body plethysmograph, and connected to a computer-controlled ventilator (Forced Pulmonary Maneuver System[®], Buxco Research Systems[©], Wilmington, North Carolina U.S.A.). This spirometer provides, semi-automatically, three different maneuvers: Boyle's Law FRC, quasi-static pressure-volume, and fast-flow volume maneuver, as previously described [37,41]. Under mechanical respiration, the Dynamic Compliance (C_{dyn}) and Lung Resistance (R_l) were determined by Resistance and Compliance RC test. To measure the Functional Residual Capacity (FRC), ventilation was stopped at the end of an expiration with an immediate closure of a valve located proximally to the endotracheal tube. Spontaneous breathing maneuvers against a closed valve with consequent pressure changes at the mouth and in the body box were then recorded to calculate the FRC by Boyle's law. To measure the Peak of Compliance (C_{pk}) and Inspiratory Capacity (IC), the quasi-static *Pressure-Volume* maneuver was performed, which inflates the lungs to a standard pressure of +30 cm H₂O and then slowly exhaled until a negative pressure of −30 cm H₂O is reached. Suboptimal maneuvers were rejected, and for each test, at least three acceptable maneuvers were conducted in every single mouse to obtain a reliable mean for all numeric parameters. At the end of the experiment, mice were decapitated after intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).

Spinal cords magnetic resonance imaging

The images acquisition was performed on the 6th, 13th, and 20th days from the first day of the EAE induction. A 4.7 NMR System (Oxford Systems) controlled by UNITY Inova-200 imaging console (Varian) was used. The mice were anesthetized with halothane (5% induction, 1.5% maintenance) mixed with oxygen (1.5 l/min) delivered by a mask. The mice's heads and bodies were slightly fixed to avoid abrupt movement during the acquisition. The scanner protocol was defined by T2-weighted (TR = 3000 ms, TE = 50 ms) spin echo multislice scans, forming 28 continuous coronal slices of 1-mm thickness, from the approximately twelfth thoracic vertebra (T12) to the nearly coccygeal 1 (Co1) [42]. The images were obtained with a resolution of 256 × 128 voxels in a slice of 3.2 × 3.2 cm. After the acquisition, the mean values from the spinal cord pixel distribution were compared according to the gray intensity level (NIH ImageJ program: <https://imagej.nih.gov/ij/>) of each slice normalized by the respective background (1 mm square on the upper right of the figure).

Real-time PCR analysis

Total RNA from 10 mg of tissue was isolated using NucleoSpin RNA kit (Macherey–Nagel) according to manufacturer's instructions. Total RNA was subsequently treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's protocol. Following this, 1 µg of total RNA was then reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific). The cDNAs, constructed from the RNAs extracted from the samples, were used to evaluate the gene expression of the Foxp3 protein. For this, TaqMan primers (Applied Biosystems, U.S.A.) were used for real-time PCR. The real-time PCR assays were performed in a final volume of 10 µl containing: 1 µl of diluted cDNA (1:5); 5 µl of PCR Master Mix (Taqman[®] Gene Express Master Mix); 0.5 µl of TaqMan 20× primer (Applied Biosystems, U.S.A.), and nuclease-free water. The reaction occurred in a 7500 Fast Thermocycler (Applied Biosystems) following the default cycling conditions. Each sample was applied in duplicate, and the data were analyzed using the 7500 v2.0.6 software (Applied Biosystems, U.S.A.). We used murine-specific probes TaqMan for gene expression assay for 18S ribosomal RNA (18s-Hs99999901_s1) (GeneBank Accession Number: X03235.1) and Foxp3 (Foxp3-Mm00475165_m1), as previously described [38]. The relative quantification of the genes was determined by normalizing the C_t values obtained in each sample, using primers for the constitutive gene 18S ribosomal RNA. C_t values greater than 35 were considered undetectable. Relative levels of expression were defined using the 2^{−ΔΔC_t} method [43].

Statistical analysis

Data showing were expressed as mean ± SEM. For the evaluation of cellular infiltration (total cells, neutrophils, macrophages, and lymphocytes), pulmonary function (C_{dyn}, Resistance, FRC, Inspiratory capacity, and Compliance Peak), pulmonary histological analysis, Foxp3⁺ cellularity, and IL-10 analysis, one-way ANOVA followed by the Tukey's post-test was used. For evaluation of vascular permeability, TNF-α, and IL-17 analysis, we used the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test. Test T was used for PCR and spinal cord histological analysis. Kruskal–Wallis test followed by a two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger, and Yekutieli post-test was used for evaluation of intravital microscopy analysis.

Table 1 Composition of the SLNs used in this work

SLN composition (%)	P188/HSPC (1:1) (%)	GMS (%)	Aqueous phase (%)	DMF (%)	SLN size (nm)
SLN free	6	3	91	-	157
SLN-DMF	6	3	89	2	315

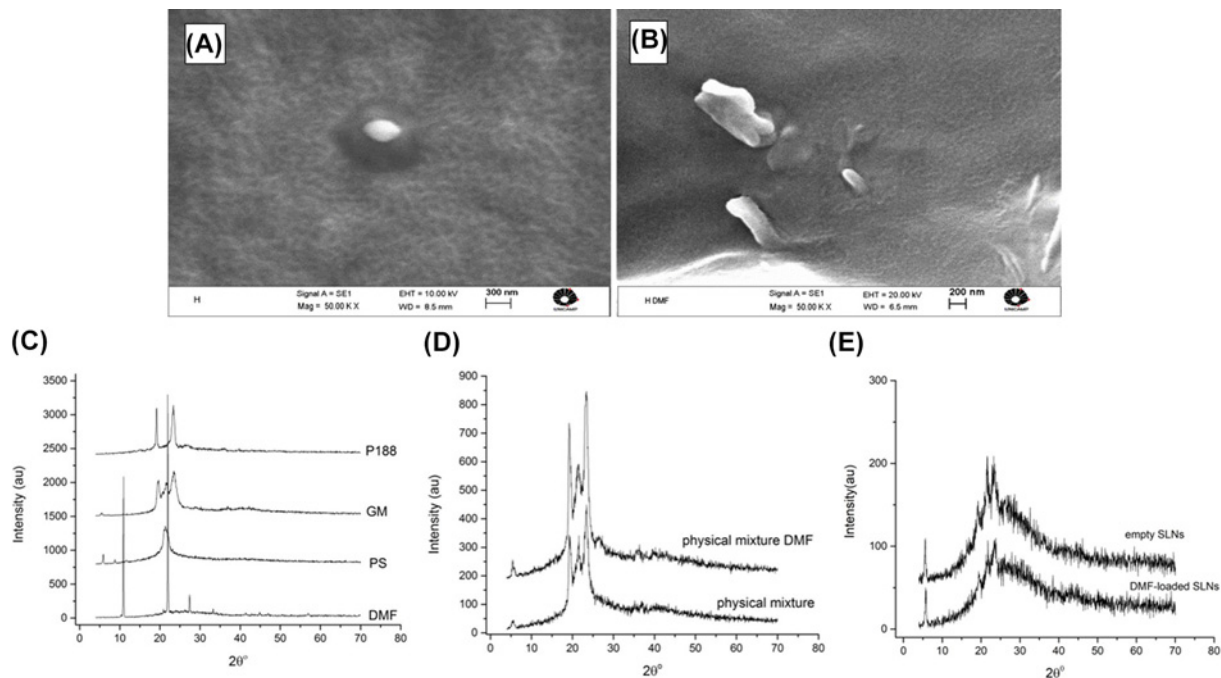


Figure 1. Physicochemical characterization of DMF-loaded SLN

SEM images from empty SLN (A) and DMF-loaded SLN (B). Diffractograms of pure components, physical mixtures of the components, unloaded SLN, and DMF-loaded SLN. Keys: (C) Free components, (D) Physical mixtures, (E) Empty SLN and DMF-loaded SLN. Abbreviation: SEM, scanning electron microscopy.

For clinical signs, body weight and MRI analysis, two-way ANOVA followed by the Bonferroni's post-test was used. Differences were considered for $P < 0.05$. The analyses were performed by Prisma version 8.0[®].

Results

Physicochemical characterization of DMF-loaded SLN

The SLN used in the present work was characterized physicochemically, as shown in Table 1. The unloaded (empty) SLN had 157 nm of average diameter, while the DMF-loaded SLN showed 315 nm of average diameter (Table 1). Thus, DMF increased the oil phase volume in the preformed nanoemulsions, leading to structural changes in the entire system and, therefore, increasing droplets diameter. The diameter values obtained by DLS using a Zetasizer Nano system ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) indicate that our delivery system of DMF is within the acceptable nanometric range for a nanoparticle. The polydispersity analysis using the DLS using a Zetasizer Nano system ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) presented values of 0.290 for the unloaded SLN and 0.435 for the DMF-loaded SLN. The low polydispersity index demonstrated homogeneity of the dispersion's diameter [44]. The ζ potential did not have significant variations with or without the presence of DMF: -18.9 and -18.5 mV, respectively. The nanoparticles exhibit negative ζ potential, which contributes to the dispersion's physical stability through electrostatic repulsion between the particles [45,46].

Through scanning electron microscopy, we obtained the images of nanoparticles (Figure 1A,B). It was observed that the SLN shapes vary from spherical to elongated forms. We also performed the XRD analysis to evaluate the physical patterns of the SLN component mixture of the empty SLN and DMF-loaded SLN, as depicted in Figure 1C–E. The XRD of the pure components, DMF showed an apparent crystalline behavior with a narrow and peak at 10.9° and

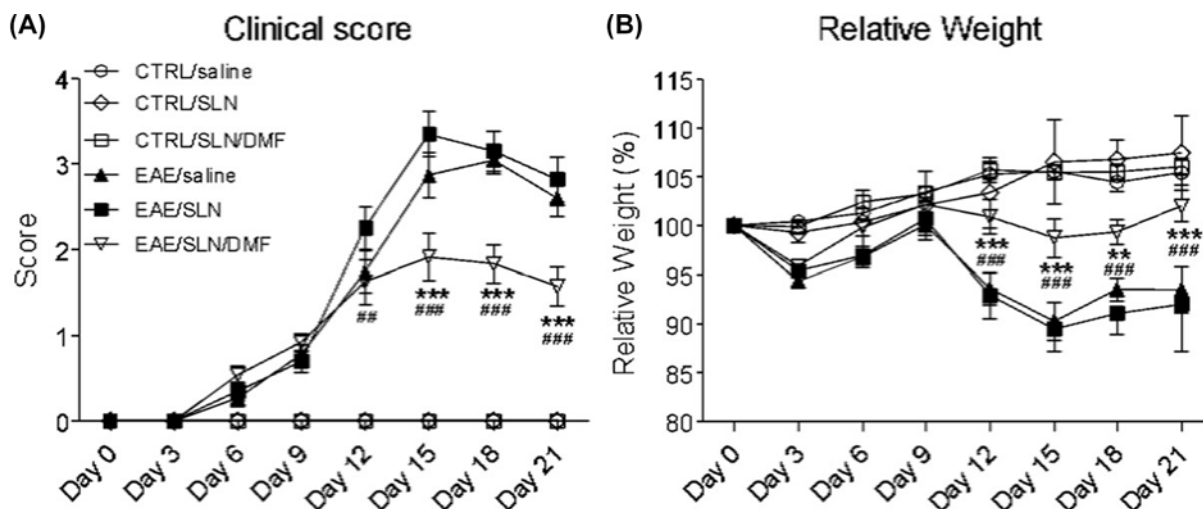


Figure 2. Analysis of the clinical evolution of EAE in mice

(A) Assessment of clinical score and (B) body weight every 72 h over 21 days after EAE induction. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$. $n = 25$ – 35 mice per group. *Significant difference between EAE/SLN/DMF and EAE/saline groups. #Significant difference between EAE/SLN/DMF and EAE/SLN groups.

the main peak at 21.92° and a non-significant peak in the region of 27.51° (Figure 1C). The main peak at 21.24° and peaks of small intensity at 6.0° and 8.84° were shown for pure hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) (Figure 1C). Pure glyceryl monostearate (GMS) presented the main peak at 23.69° and peaks of lower XRD pattern intensities at 19.74° and 21.65° (Figure 1C). The pure P188 (poloxamer 188) showed peaks at 19.06 and 23.29° (Figure 1C). In general, our data reveal that all components of the SLN including the DMF drug contain well defined degrees of crystallinity. A similar degree of crystallinity was observed in the physical mixture of the SLN components regardless of the presence of DMF (Figure 1D). Despite the preserved crystallinity of the physical mixture of components, there was a marked decrease in crystallinity due to the structural organization of SLN after preparation, also presented by DMF-loaded SLN, indicating an appreciable degree of interaction between the DMF and the structural components of SLN (Figure 1E).

Inhalation of DMF-encapsulated SLN protects mice from EAE clinical manifestation, blood–brain barrier permeability, and CNS injury induced by MOG_{35–55}

The therapeutic potential of DMF encapsulated SLN was evaluated *in vivo* using an EAE experimental model induced by MOG_{35–55} in mice. Mice were divided into six groups, as follows: control + saline (CTRL/saline); control + empty SLN (CTRL/SLN); control + SLN + DMF (CTRL/SLN/DMF); EAE + saline (EAE/saline); EAE + empty SLN (EAE/SLN); and EAE + SLN + DMF (EAE/SLN/DMF). Mice received aerosolized administration of the respective treatments beginning at the time of disease induction, by nebulization during 30 min/day with an interval of 72 h, and during 21 days. The DMF-treated mice received 6.0 mg/ml SLN+DMF/animal/dose or saline nebulized in control groups. Our results showed that EAE-induced mice undergoing inhalation of saline (EAE/saline) or empty SLN (EAE/SLN) were similar during the development of clinical disease signs, marked by a progressive increase in score and weight loss when compared with the control groups, as observed on 15th, 18th, and 21st d.p.i. (Figure 2). In this study, the highest score observed was characterized by the presence of paralysis of both hind legs in mice treated with saline and SLN (Figure 2A). However, EAE disease in mice treated with DMF encapsulated into SLN (EAE/SLN/DMF) presented lower clinical scores when compared with the respective controls: EAE/saline and EAE/SLN groups (Figure 2A), at the 15th, 18th, and 21st d.p.i. In addition, the EAE/SLN/DMF-treated mice also presented a reduction in body weight loss compared with the EAE/saline and EAE/SLN groups on days 12th, 15th, 18th, and 21st days d.p.i. (Figure 2B). There were no statistical differences observed between the control and vehicle groups (Figure 2).

To further investigate the effects of DMF-encapsulated SLN in CNS of EAE induced mice, we evaluate the integrity of the blood–brain barrier (BBB) in the brain and spinal cord tissues using the Evans Blue protocol (Figure

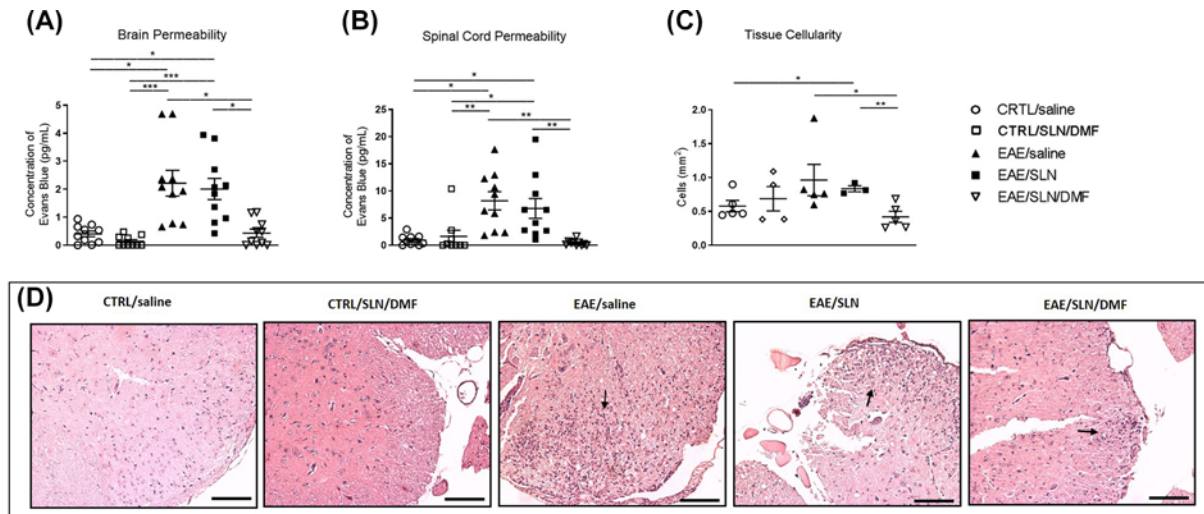


Figure 3. Evaluation of the CNS inflammatory process

Analysis of brain (A) and spinal cord (B) vascular permeability and tissue cellularity of the spinal cord (C) during EAE induced by MOG_{35–55} in mice. (D) Representative photomicrographs of H&E staining in the thoracolumbar spinal cord on the 21st day after EAE induction. The arrows show regions with the presence of inflammatory infiltrate with a predominance of mononuclear cells. 10× magnification. Bar = 5 µm. Data are expressed as mean ± SEM. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

3A,B). In the brain, there was an increase in vascular leakage in the EAE/saline and EAE/SLN groups compared with CTRL/saline and CTRL/SLN/DMF groups (Figure 3A). At the same time, the EAE-induced mice that received nebulized DMF-encapsulated SLN presented a reduction in cerebral plasma leakage compared with EAE/saline and EAE/SLN groups (Figure 3A). Regarding the spinal cord, the EAE/saline and EAE/SLN groups had increased vascular permeability when compared with the CTRL/saline and CTRL/SLN/DMF groups (Figure 3B). However, the EAE-induced mice treated with inhalation of SNL containing DMF presented a reduction in spinal cord vascular permeability compared with the EAE/saline and EAE/SLN groups (Figure 3B). In order to characterize the magnitude of the tissue inflammation and damage, we measured the cellular infiltration into spinal cord tissue (Figure 3C) by morphometric analysis. Our results showed that the EAE/SLN administration presented increased cellularity compared with the CTRL/saline group (Figure 3C). Moreover, EAE/SLN/DMF-treated mice showed a reduction in tissue cellularity compared with the EAE/SLN and EAE/saline groups (Figure 3C).

We also confirmed whether the inhalation of DMF-encapsulated SLN could attenuate the white matter lesions in the spinal cord of EAE-induced mice (Figure 4). Conventional structural imaging using T2 contrast enables the detection of macroscopic white matter lesions (loos) through enhanced signal in demyelinated regions [47,48] (Figure 4A,B). Thus, according to the analyses, the EAE-induced mice showed a significant increase in the signal of gray intensity from the 13th d.p.i. when compared with CTRL/saline group. It is important to highlight that on the 13th d.p.i. the signal intensity for the saline EAE group was even more significant compared with CTRL/saline group (Figure 4C,D). However, once the inhalation of DMF-encapsulated SLN was able to reduce the white matter deterioration at 20th d.p.i. (Figure 4C,D), no statistical differences were observed when comparing EAE/SLN/DMF and EAE/saline groups, suggesting that it may contribute to attenuated mice clinical signs during DMF-encapsulated SLN treatment.

Inhalation of DMF-encapsulated SLN increases leukocyte influx into the spinal cord microvasculature but attenuates brain inflammation during EAE induced by MOG_{35–55} in mice

CNS inflammation is marked by increased interaction between leukocytes and endothelium caused by an immune response against BBB during EAE manifestation. Intravital microscopy of the spinal cord microcirculation from control and EAE-induced mice was performed on the 21st d.p.i. in order to evaluate the impact of DMF-encapsulated SLN inhalation in leukocyte–endothelium interactions in CNS *in vivo*. Our results showed that EAE/saline-treated mice exhibited an increased number of leukocytes rolling and adhesion on endothelium from central and post-capillary venules compared with control mice, similar to EAE/SLN mice group (Figure 5A–E). Moreover,

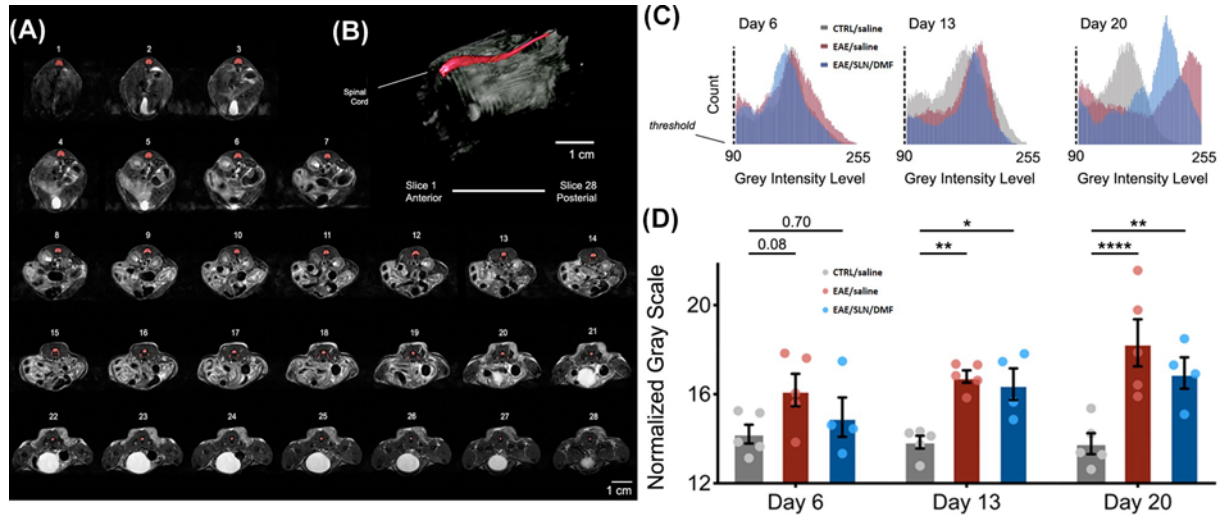


Figure 4. Conventional structural imaging using T2 contrast

(A) Representation of 28 continuous coronal slices covering from approximately twelfth thoracic vertebra (T12) to the nearly coccygeal 1 (Co1). The red mask represents the respective regions of interest analyzed. **(B)** 3D representation of the animal's body with emphasis on the spinal cord in red. **(C)** Representative histograms of the 6th, 13th, and 20th covering the pixel distribution according to the gray intensity level. In gray, CTRL/saline group; Red, EAE/saline group; Blue, EAE/SLN/DMF group. **(D)** Comparison of the gray intensity level over 6th, 13th, and 20th. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; and **** $P < 0.00001$ indicate differences from the respective control group.

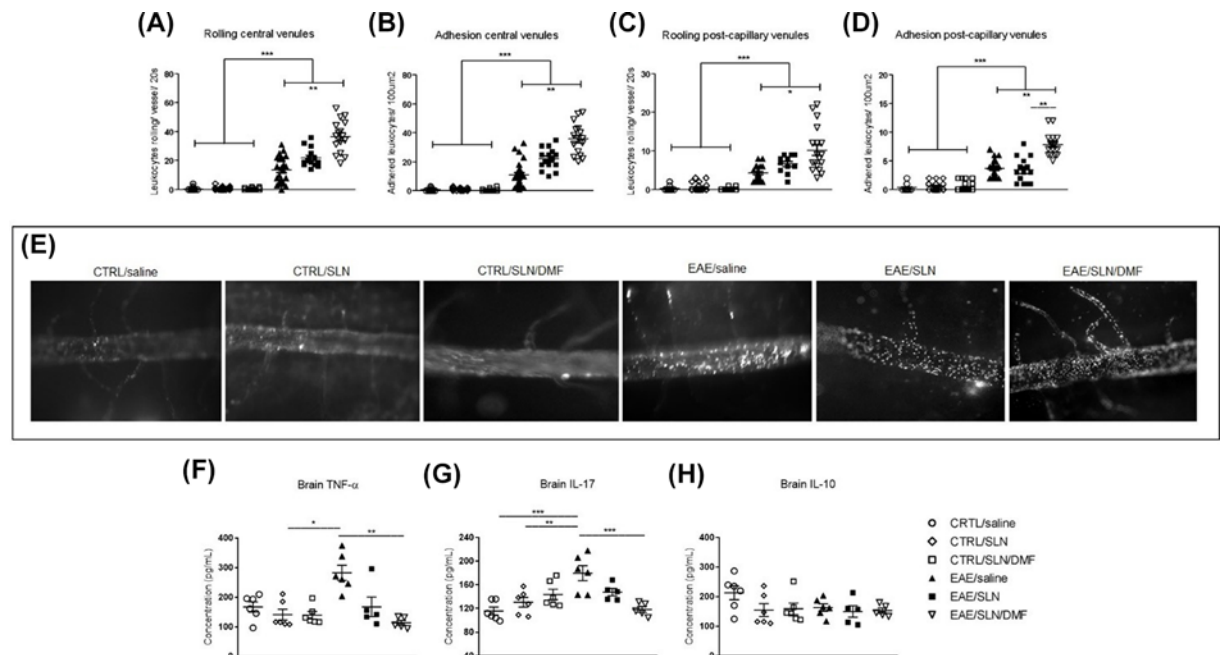


Figure 5. Analysis of the endothelium–leukocyte interaction in the spinal cord microvasculature by intravital microscopy and brain cytokine levels

(A) Analysis of the number of leukocytes rolling in the central venules. **(B)** Analysis of the number of leukocytes adhered to each 100 μm^2 endothelium of the central venules. **(C)** Analysis of the number of leukocytes rolling in the post-capillary venules. **(D)** Analysis of the number of leukocytes adhesion to each 100 μm^2 of the endothelium of the venules post-capillary. **(E)** Representative images of leukocyte recruitment visualized by intravital microscopy. The fluorescent dots indicate the leukocytes. 10 \times objective. Evaluation of TNF- α **(F)**, IL-17 **(G)**, and IL-10 **(H)** brain cytokines levels, by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

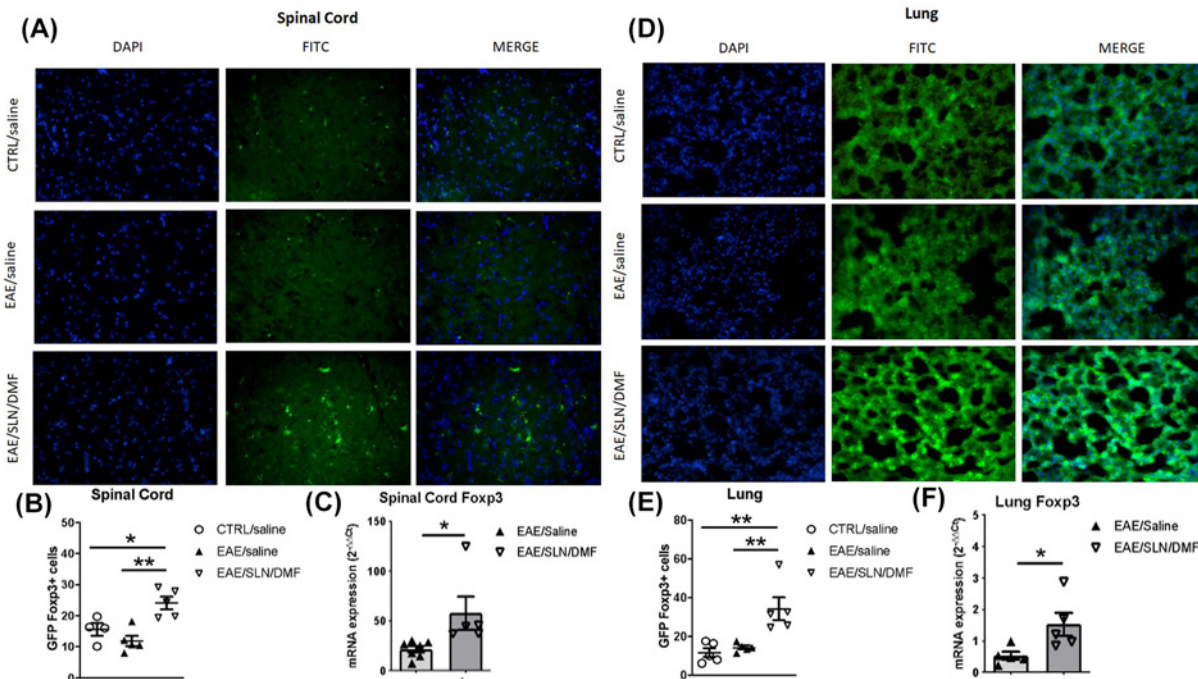


Figure 6. Immunolocalization of Fxp3⁺ leukocytes in CNS and lung tissue in mice

Photomicrograph of DAPI (blue), FITC (green), and MERGE of the spinal cord (A) and lung tissue (D) in mice Fxp3 GFP⁺. (B) Quantification of Fxp3 GFP⁺ cells and (C) Fxp3 mRNA expression in the spinal cord and (E,F) lung tissue. Data are expressed as mean ± SEM. *P<0.05; **P<0.01.

EAE/SLN/DMF-treated mice showed an increase in the number of leukocytes rolling and adhesion on endothelium from central and post-capillary venules compared with the EAE/saline mice group (Figure 5A–E).

To further investigate the cerebral inflammatory cytokine profile related to EAE manifestation, ELISA protocol has been used to quantify TNF-α, IL-17, and IL-10 in cerebral tissues. EAE/saline mice group presented increased levels of inflammatory cytokines related to the onset of EAE disease compared with controls (Figure 5F,G). In addition, EAE/SLN/DMF inhaled mice showed a reduction in TNF-α and IL-17 cytokine levels compared with EAE/saline (Figure 5F,G). There are no changes in levels of the anti-inflammatory/regulatory cytokine IL-10 in mice brains (Figure 5H). Thus, EAE/SLN/DMF treatment by inhalation attenuates the proinflammatory cytokine but increases the leukocyte interaction with BBB from mice that presented better clinical signs *in vivo*.

Treatment with inhaled DMF-encapsulated SLN promotes Fxp3⁺ leukocyte accumulation into the spinal cord and lungs during EAE induced by MOG_{35–55} in mice

Despite the protection observed by DMF-encapsulated SLN inhalation in mice, like reduced clinical signs and brain inflammation of EAE, but increased leukocyte rolling and adhesion in spinal cord vasculature, we further investigated the T regulatory lymphocytes (Tregs) population. We aimed to use the transgenic mice for the Fxp3, a transcription factor marker of Tregs, expressing GFP fluorescence (Fxp3 GFP⁺) to quantify the Treg cells in the spinal cord and lung tissues by immunofluorescence (Figure 6). Our results showed that in the spinal cord tissues from CTRL/saline and EAE/saline mice groups, the Fxp3⁺ expression was very similar and low grade (Figure 6A,B). However, the EAE mice treated with DMF-encapsulated SLN presented an increased influx of the Fxp3⁺ cells when compared with the CTRL/saline and EAE/saline mice groups (Figure 6A,B), also confirmed by the higher Fxp3 mRNA expression of EAE/SLN/DMF treated mice in relation to EAE/saline group (Figure 6C). We also evaluated the impact of DMF-encapsulated SLN inhalation in lungs from mice submitted to EAE disease (Figure 6D–F). In the same way, as found in brain tissues, the CTRL/saline and EAE/saline mice groups exhibited similar counts of Fxp3⁺ cells in the lungs (Figure 6D,E). However, the number was higher in EAE/SLN/DMF treated mice group (Figure 6D,E), also confirmed by higher Fxp3 mRNA expression when compared with EAE/saline mice group (Figure 6F).

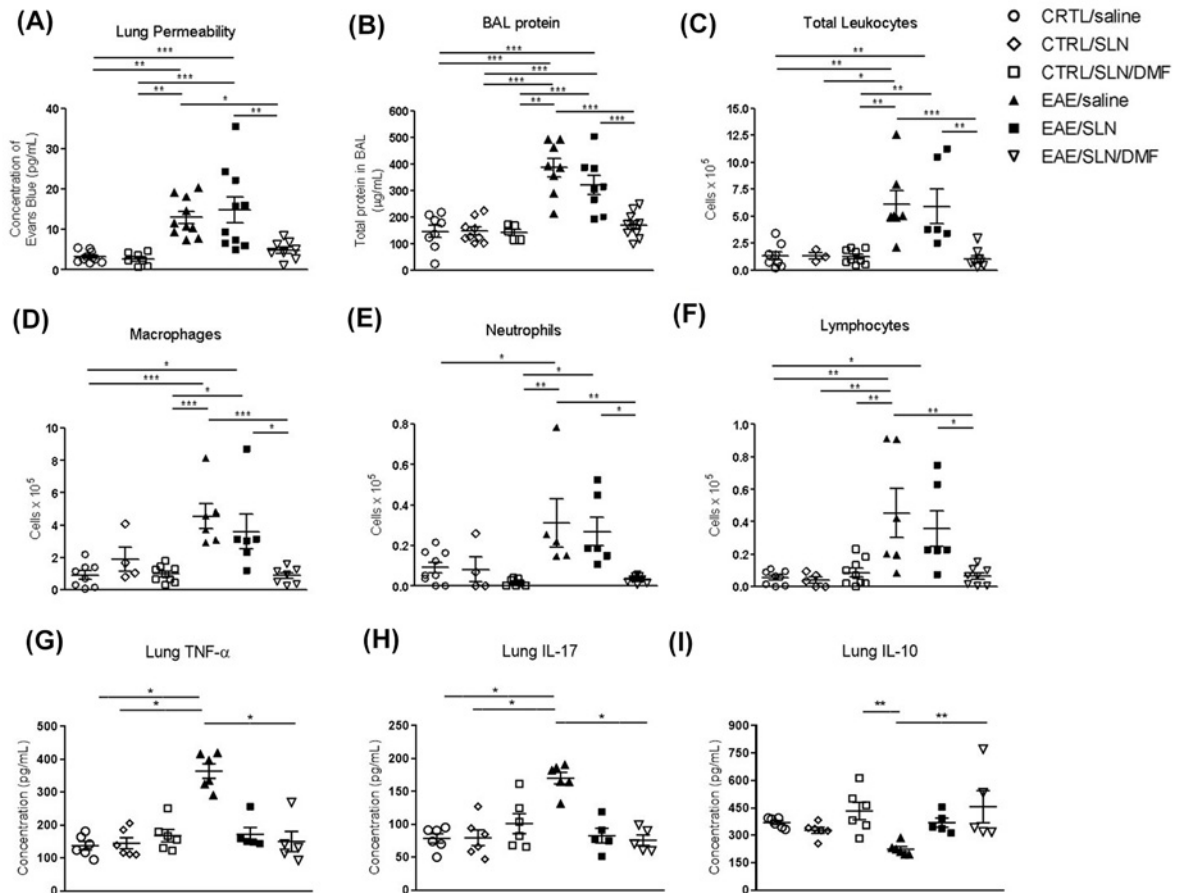


Figure 7. Characterization of pulmonary inflammation associated with EAE disease in mice

Analysis of lung permeability (A), BAL protein (B), total leukocytes (C), macrophages (D), neutrophils, (E) and lymphocytes (F). Quantification of TNF- α (G), IL-17 (H), and IL-10 (I) lung cytokines' levels. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Abnormal pulmonary inflammation and dysfunction occur during EAE manifestation and are controlled by inhalation of DMF-encapsulated SLN in mice

Lungs have been implicated in the generation of an immune response, including in the context of EAE challenged mice [49]. Because the airways were used as the route of administration of inhaled DMF-encapsulated SLN, we investigated the possible effects on lung tissue such as inflammation (protein leakage, leukocyte influx, and cytokine production), lung injury, and possible respiratory mechanical dysfunction in mice. First, we evaluated the pulmonary vascular permeability using two distinct protocols: the Evans Blue protocol was used in lung tissues, and total protein quantification by Bradford protocol from samples of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) recovered after 21st day of EAE induction in mice. Our results showed that the DMF-encapsulated SLN inhalation in CTRL/SLN/DMF mice group altered neither lung permeability by Evans Blue (Figure 7A) nor protein leakage into the airways by Bradford quantification (Figure 7B). Mice belonging to the EAE/saline and EAE/SLN groups presented increased pulmonary vascular permeability (Figure 7A,B) characteristics of lung diseases when compared with the CTRL/saline and CTRL/SLN/DMF mice groups. However, inhalation of DMF-encapsulated SLN in EAE mice was able to reduce lung permeability, as confirmed by Evans Blue and Bradford protocols, when compared with EAE/saline and EAE/SLN groups (Figure 7A,B).

Bronchoalveolar lavage was performed to evaluate the leukocyte populations in the airways. The total leukocyte counts in BALF recovered from CTRL/SLN and CTRL/SLN/DMF mice groups were very similar compared with the unchallenged mice CTRL/saline group (Figure 7C), presenting low numbers of macrophages, neutrophils, and

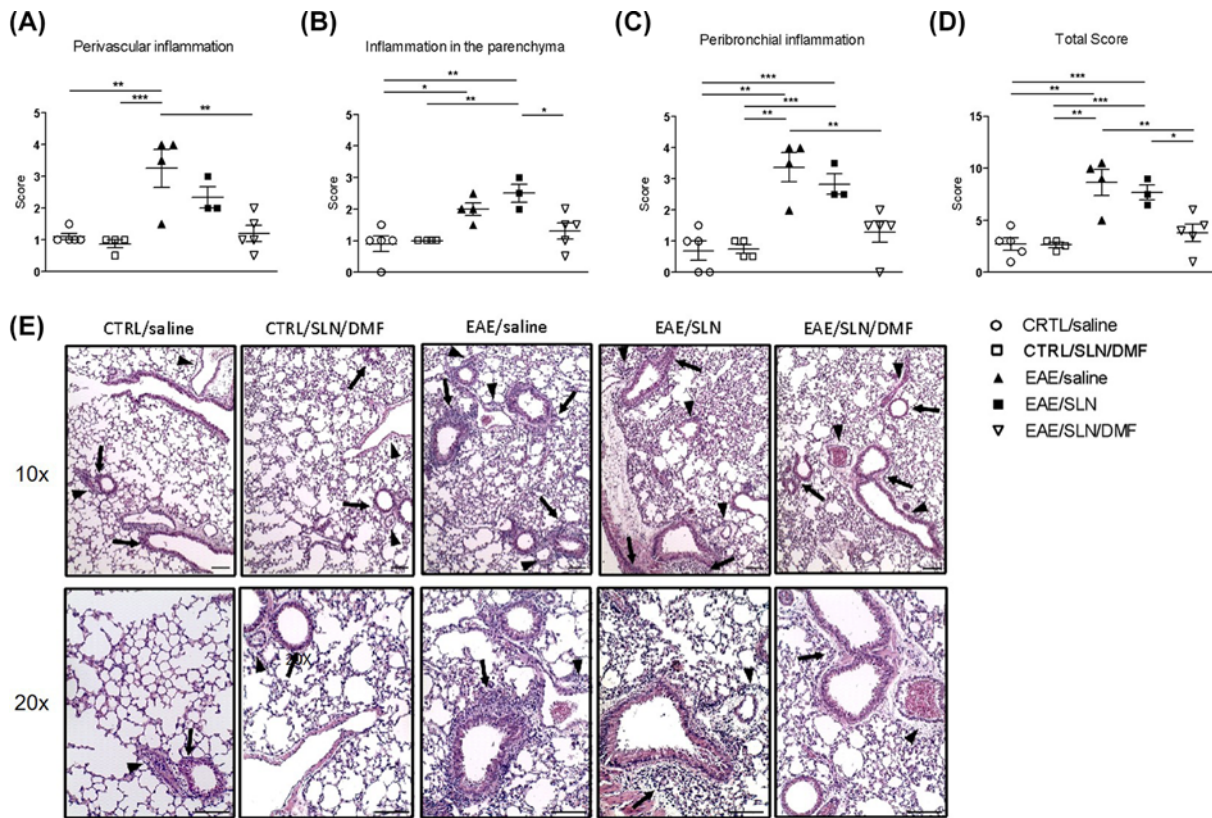


Figure 8. Pulmonary pathology manifestation in mice with EAE disease

Evaluation of lung (A) perivascular inflammation, (B) inflammation in the parenchyma, (C) peribronchial inflammation scores, and (D) the total scores. (E) Representative photomicrographs of lung H&E staining on the 21st day after EAE induction. The arrows show regions with the presence of peribronchial areas, and arrowheads represent perivascular space—20× magnification. Bar = 50 μm. Data are expressed as mean ± SEM. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

lymphocytes (Figure 7D–F). However, EAE/saline and EAE/SLN mice groups showed a marked increase in leukocyte numbers in BALF (Figure 7C) compared with their respective controls. This leukocyte population was composed predominantly of macrophages with a smaller mixed-population consisting of neutrophils and lymphocytes (Figure 7D–F). The EAE mice that received inhalation with DMF-encapsulated SLN showed a reduction in the number of total leukocytes from BALF (Figure 7C), reducing the macrophage, neutrophil, and lymphocyte numbers to the basal levels (Figure 7D–F) compared with the EAE/saline and EAE/SLN mice groups.

The ELISA protocol was performed to assess the lung cytokines concentration. Our results showed that the inhalation of SLN empty or SLN/DMF in control mice did not interfere with TNF-α, IL-17, and IL-10 levels quantified in lung samples (Figure 7G–I). However, EAE/saline mice group presented increased TNF-α and IL-17 levels in lungs when compared with CTRL/saline and CTRL/SLN groups (Figure 7G,H), as well as a lower in IL-10 concentration when compared with CTRL/SLN/DMF mice group (Figure 7I). On the other hand, inhalation of DMF-encapsulated SLN decreased the lung levels of TNF-α and IL-17 in EAE/SLN/DMF mice group (Figure 7G,H), with increased IL-10 when compared with EAE/saline mice group (Figure 7I).

To further evaluate the lung injury, tissue pathology based on a score that characterizes the inflammatory manifestations of the lung sites was performed in three regions: perivascular inflammation, parenchymal inflammation, and peribronchial inflammation. Control mice that received inhalation of DMF-encapsulated SLN, CTRL/SLN/DMF, showed no apparent pathological changes (Figure 8A–D) in the perivascular (arrowheads), parenchymal, and peribronchial (arrows) regions depicted in (Figure 8E), as well as observed in CTRL/saline mice group. Our results also demonstrated that EAE/saline and EAE/SLN mice groups revealed an increase in lung inflammation, marked by intense perivascular (Figure 8A,E, arrowhead) and peribronchial (Figure 8C,E, arrowhead) inflammation, and less intense in the parenchyma areas (Figure 8B,E) when compared with the CTRL/saline and CTRL/SLN/DMF mice groups. On the other hand, the EAE/SLN/DMF mice group presented a reduction in the perivascular (Figure

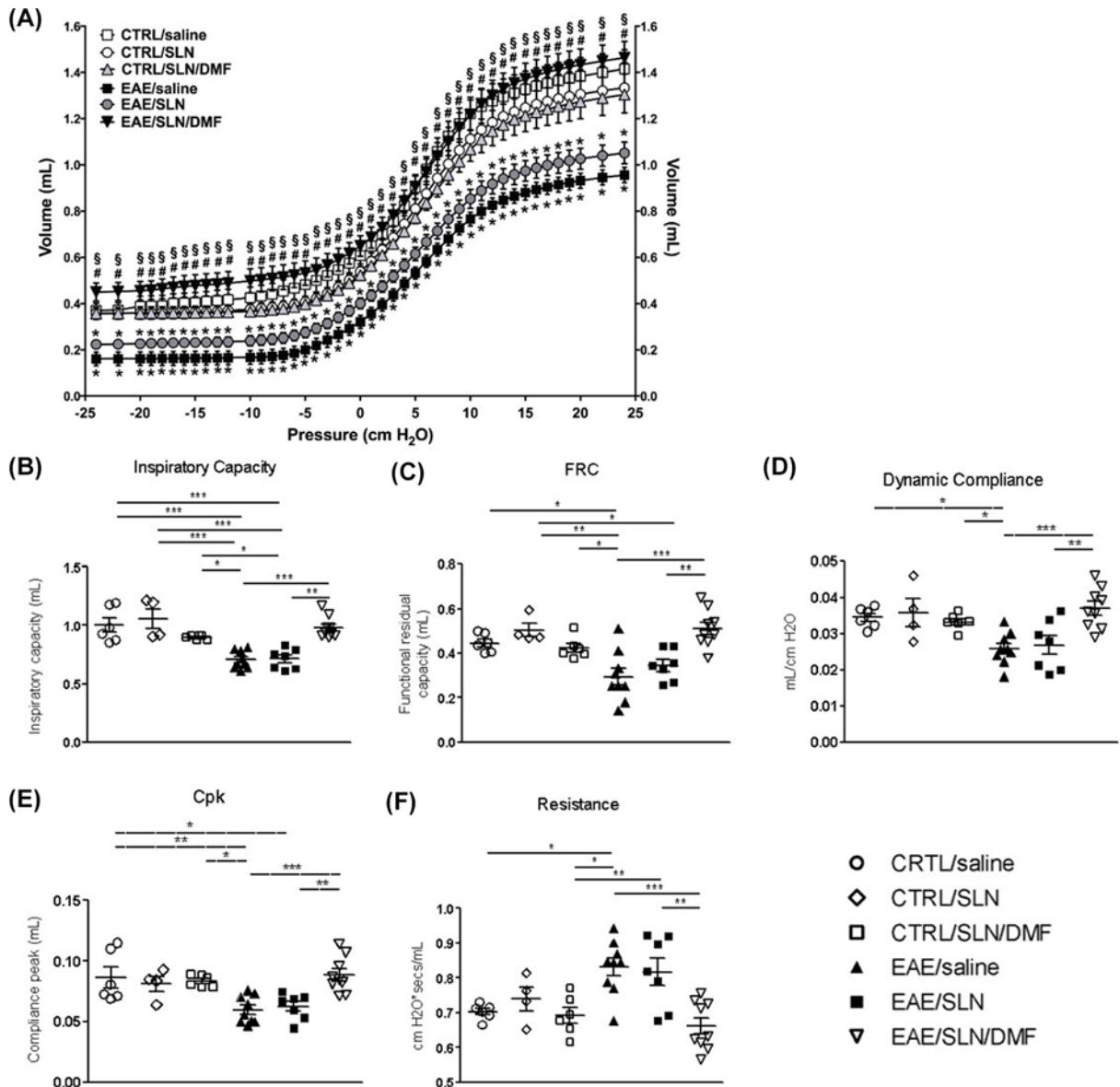


Figure 9. Spirometry analysis of pulmonary mechanic dysfunction related to EAE disease in mice

Evaluation of (A) pressure–volume curve, (B) inspiratory capacity, (C) FRC, (D) Cdyn, (E) peak compliance, and (F) resistance. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; § $P < 0.05$ versus EAE saline; # $P < 0.05$ versus EAE/SLN. FRC: Functional Residual Capacity; Cpk: Peak of Compliance.

8A,E, arrowhead) and peribronchial (Figure 8C,E, arrowhead) inflammation, also observed in the parenchyma areas (Figure 8B,E), when compared with the EAE/saline mice group. In general, the total score indicated that inhalation DMF-encapsulated SLN was able to revert the pulmonary inflammatory process evidenced in EAE/saline and EAE/SLN mice groups (Figure 8D). Furthermore, we found that the treatment by inhalation of the control group with DMF-encapsulated in SLN did not cause any toxic or adverse effects on the mice airways.

Regarding pulmonary function, the inflammatory process generally leads to profound alterations of lung mechanics, such as volumes, elasticity and flow loss, is an excellent predictive of lung disease manifestation. We used invasive spirometry to evaluate the security of our DMF-encapsulated SLN formulation in control mice and mice with EAE. Our results revealed that inhalation in CTRL/SLN and CTRL/SLN/DMF mice groups does not cause functional respiratory loss when compared with CTRL/saline group, as observed by the regular pattern of the Pressure \times Volume curve (Figure 9A), Inspiratory Capacity (Figure 9B) and FRC (Figure 9C), in the same way, that it does not

interfere with the lung elasticity measured by Cdyn (Figure 9D), Cpk (Figure 9E), and RI (Figure 9F). However, the EAE/saline and EAE/SLN mice groups showed reduced Pressure \times Volume curve (Figure 9A), Inspiratory Capacity (Figure 9B), FRC (Figure 9C), Cdyn (Figure 9D), Cpk (Figure 9E), and increased RI (Figure 9F) when compared with the CTRL/saline group and CTRL/SLN/DMF mice groups. Notwithstanding the dysfunction presented by EAE mice treated with saline or SLN, the inhalation of DMF-encapsulated SLN recovered the pulmonary function from EAE/SLN/DMF mice group, as showed by preserved Pressure \times Volume curve (Figure 9A), Inspiratory Capacity (Figure 9B), FRC (Figure 9C), Cdyn (Figure 9D), Cpk (Figure 9E), and RI (Figure 9F) when compared with the mice of the EAE/saline and EAE/SLN mice groups. Collectively, these results demonstrate that EAE disease is associated with a pulmonary pathology characterized by protein leakage into the airways with the presence of leukocytes and tissue inflammation related to reduced lung function, and the DMF-encapsulated SLN administration via inhalation was able to protect mice from lung diseases, as well as the clinical manifestation of EAE. DMF-encapsulated SLN has also been shown to be harmless when administered to control mice (CTRL/SLN/DMF), suggesting that this route of administration is safe.

Discussion

MS is considered the most common cause of non-traumatic neurological disability [50]. For the study of the disease, animal models of EAE are used to understand the biological mechanisms of MS and establish forms of treatment [51,52]. The main drugs used for MS treatment are glatiramer acetate, interferon- β , natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone [53,54]. However, the above currently used therapies are usually associated with inconvenient methods of administration, severe side effects besides reducing the rate of adhesion and permanence of the patients to the therapy [55].

DMF is a potent agonist of hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCAR2), and when administered orally, is rapidly metabolized to MMF, crossing the BBB, and reaching the CNS [56,57]. As demonstrated here, the inhaled DMF encapsulated SLN reduced the clinical signs of EAE and weight loss associated with this model, mainly by reducing CNS auto-inflammation and BBB damage. Similar results were observed in previous studies in which the oral administration of DMF was able to attenuate the severity of EAE [58–61]. Previous studies have suggested the anti-inflammatory and neurocytoprotective role of DMF [62,63]. Moreover, this drug can act on astrocytes and microglia, inhibiting the synthesis of neuroinflammatory mediators [57].

The inhalatory route is an alternative form of administration of drugs to the CNS, presenting several benefits compared with the intravenous and oral forms. First, intranasal delivery of molecules provides direct access to the CNS without necessarily crossing BBB through the olfactory or trigeminal pathway [64–66]. Secondly, the exposure of peripheral organs and tissues to the drug is usually greatly reduced, thereby attenuating potential adverse effects. Third, from a clinical therapeutic point of view, it is well recognized that drug nebulization is a non-invasive form of administration [67]. Moreover, this DMF inhalation route may potentially contribute to improving the lack of tolerability and low persistence rates observed with oral administration, where one-third of patients initiating DMF stopped treatment within 1 year of follow-up, and at 2 years, only 43% of patients remained persistent [14].

The pathophysiology of MS and the mice EAE model involve the migration of autoreactive inflammatory cells into the CNS, triggering neuroinflammation [68,69]. Moreover, there is a close relationship between the severity of the disease and the rupture of BBB integrity, leading to an increase in the mononuclear and lymphocyte infiltrate in the CNS [70]. In fact, it is already well elucidated that in EAE induced by MOG_{35–55}, there is a marked cellular infiltrate in the meninges and the parenchyma of the spinal cord [71]. As expected, H&E microphotography demonstrated that the EAE/saline group presented a prominent inflammatory infiltrate in the spinal cord concerning the CTRL groups. In contrast, the treatment of EAE mice with DMF-encapsulated SLN was able to reduce spinal cord inflammation. Corroborating our results, a previous study showed that DMF induced a significant reduction in spinal cord macrophages infiltration 27 days after injection of MOG_{35–55} peptide [61]. At the same time, another research demonstrated a decrease in Th1 and Th17 CNS infiltration in EAE mice treated with DMF [23].

Transendothelial migration is a critical step in the inflammatory response in which leukocytes cross bloodstream endothelial cells lining and infiltrate at the site of inflammation. Visualization of leukocyte–endothelial cell interactions *in vivo* in inflamed vessels has revealed a multistep process in which leukocytes must first tether and roll along the endothelium before they can firmly adhere and emigrate out of the vessel [25]. In order to understand the cellular mechanisms underlying the improvement in the EAE clinical course induced by DMF-encapsulated SLN inhalation, *in vivo* spinal cord leukocyte rolling, and adhesion to the CNS vasculature were assessed by intravital microscopy. For the first time, our data demonstrated an increase in the leukocytes rolling, and adhesion within spinal cord microvasculature in EAE/SLN/DMF-treated mice. Considering the increase in DMF-induced leukocyte rolling and adhesion

in the spinal cord microvasculature, we hypothesized that DMF could modulate Foxp3⁺ cells in the spinal cord and lungs. Our results demonstrated an increase in the Foxp3⁺ cells in lungs and spinal cords confirmed by mRNA expression in the EAE mice treated by inhalation DMF-encapsulated SLN. It is known that Foxp3's stable expression is essential for the role of Treg cells [72]. In addition, it is sufficiently elucidated in the literature that Treg cells have a reduced frequency and functional impairment in patients with MS, related to disease progression [72–74]. On the other hand, the study demonstrated an increase in peripheral Tregs in MS patients treated for 6 months with DMF [75].

The BBB is formed by the junction of the endothelial cells, pericytes, and astrocytes [50,76], being responsible for restricting the movement of external organisms and toxic substances, allowing only the transport of selected molecules, such as oxygen, carbon dioxide, and glucose, utilizing transport proteins [76]. It is already known that the probable mechanism associated with BBB integrity dysfunction in MS is related to endothelial damage mediated in part by the increase in pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-17, IL-22 and TNF- α [77], showing changes in the proteins that constitute tight junctions in the CNS vasculature of MS patients [78]. In fact, our study revealed that EAE mice treated with saline or SLN showed an increase in brain and spinal cord vascular permeability. In the EAE model, the T-cell invasion through the BBB consists of a mechanism that precedes the autoimmune manifestation associated with pathology [79], which can cause the onset of lesions along the barrier [80]. On the other hand, EAE/SLN/DMF inhaled mice were able to reduce cerebral and spinal cord vascular permeability. Studies conducted by Kunze et al. (2015) showed that in an *in vivo* model of ischemia, treatment with DMF significantly prevented the formation of edema, in addition to stabilizing BBB, avoiding the rupture of interendothelial tight junctions [81]. In addition, our study demonstrated an increased in brain TNF- α and IL-17 levels in EAE/saline group. On the other hand, DMF-encapsulated into SLN was able to reverse this condition. Corroborant with our results and *in vivo* study demonstrated that T cells from EAE mice produced high amounts of IL-17 and IFN- γ , while DMF treatment decreased these concentrations [82]. *In vitro*, DMF was also able to inhibit the expression of inflammatory cytokines and leukocyte transmigration by activating the transcription factor, nuclear factor-derived erythroid-derived factor 2 (Nrf2) [81].

MRI has contributed consistently to the diagnosis of MS [83]. In addition, this technique aims to provide valuable data on disease progression [84]. Like the brain, the spinal cord is also a clinically important site, affected by pathological changes in most MS patients [85]. In the *in vivo* MRI analysis, we observed that EAE/saline group presented an increase in the signal intensity captured, and the DMF in SLN was capable of reducing this scale. Spinal cord atrophy is commonly found in MS patients. The reduction in the spinal cord volume happens preferably due to the process of axonal loss of the white matter [85]. In addition, an increase in edema in the CNS can be observed in patients with MS, visible as diffuse hyperenhancement on T2-weighted or FLAIR images [86]. Supporting our results, previous studies have shown that DMF potentiated the activation of Nrf2, which has cytoprotective effects on oligodendrocytes, neurons, and glial cells [6,12,23].

As evidenced by our results, the mice belonging to the EAE/saline group showed an increase in the number of inflammatory cells in BAL and in the proinflammatory cytokines, in addition to a reduction in lung function. Several studies have suggested that the lung may be responsible for an essential role in autoimmunity [33,87]. According to Odoardi et al. (2012), before the entry of autoreactive T cells into the CNS, these establish in the lung, reactivate and acquire the capacity to enter the CNS [49]. The lung has a unique immune environment that maintains the body's homeostasis by inhibiting immune responses exacerbated against external stimuli [32]. However, the role of the pulmonary immune system in the development of the autoimmune inflammatory process in the CNS has not yet been fully understood. In our hands, DMF-encapsulated SLN inhalation reduced vascular permeability and leukocyte influx in airways related to attenuated peribronchial inflammation, improving lung function, also contributing to better clinical manifestation of EAE disease. Our findings suggest that inhalation of DMF-encapsulated SLN could induce Treg cells in lungs that dampens local and systemic inflammation of CNS, ascribing the attenuated clinical signs in treated mice. The effects of DMF on pulmonary pathologies have already been previously described but not in pulmonary dysfunction associated with EAE [88–91]. DMF acts on the HCAR2, a G protein-coupled receptor associated with the cell membrane, promoting its various effects on the organism, such as inhibition of neutrophil infiltrates [57]. DMF treatment is effective in reversing hemodynamic changes, reduction of inflammation, oxidative damage, and fibrosis in experimental models of pulmonary arterial hypertension and pulmonary fibrosis [89]. As in the CNS, in the lung, DMF can inhibit the pro-inflammatory signaling triggered by NF- κ B activation and, consequently, attenuating the inflammatory process [89,91]. Indeed, we found reduced TNF- α and IL-17 levels in the lung from the DMF-encapsulated SLN mice group, suggesting an anti-inflammatory role of DMF locally administered in mice lungs. Finally, DMF-encapsulated SLN inhalation in control mice demonstrated it to be safe when administered by airway route in mice.

Curiously, we also observed that the EAE/SLN group showed some similarities with the EAE/SLN/DMF group, exclusivity in the assessment of cerebral and pulmonary cytokine levels. Some studies have shown the anti-inflammatory effects of poloxamer-188, which is one of the SLN constituents [92–94]. In this aspect, the EAE/SLN group, besides having similar faith to the EAE/SLN/DMF group, had no significant differences compared with the EAE mice treated with saline solution. Moreover, the EAE/SLN group also showed an increase in animal clinical signs, indicating that the empty SLN themselves cannot attenuate the symptoms of EAE mice.

In summary, the present study reveals for the first time that nebulized DMF-encapsulated SLN acts in the CNS inflammation process but also may have a relevant functional role directly in the lungs, ameliorating lung inflammation and function. Finally, DMF locally attenuated the pulmonary inflammatory infiltration and could lead to less immune cell autoreactivity [49] and, in turn, the lower autoimmune response against the mice BBB in CNS. Altogether, our results suggest that inhaled SLN containing DMF may represent a potential alternative therapeutic protocol for MS treatment.

Clinical perspectives

- Current MS treatments, including oral drug DMF, are associated with several side effects and inconvenient administration methods, contributing to patients' therapy discontinuation.
- For the first time, our results demonstrated that DMF-loaded SLN inhalation improves the clinical outcome of EAE, besides reducing CNS inflammatory processes. Moreover, the inhalation treatment did not cause any toxicity or adverse effects in the mice airways. We also evidenced that abnormal inflammation and dysfunction in the lung tissue that occurs during EAE is attenuated by inhalation of DMF-encapsulated SLN.
- Our results suggest that inhaled DMF-encapsulated SLN may represent a promising alternative for the treatment of MS patients. Our findings may contribute to accelerating the nanoparticles clinical translation and enhance the idea that precision medicine applications may benefit from inhalatory nanoparticle-based drug delivery, improving drug bioavailability, reducing the dose, and overcoming the patient non-adherence to currently used drugs.

Data Availability

All data related to the present study is already present in the paper.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant numbers 454916/2014-0, 309810/2017-5, 28/2018, 168640/2018-0, 303345/2018-7, 421424/2018-4]; the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [grant numbers CBB-APQ-03277-16, RED-00570-16, RED-00313-16, PPM-00508-18, APQ-03950-17, APQ-01899-18]; the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant numbers 2013/22141-5, 2016/14264-8]; the Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) [grant number 201710267000208]; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [grant numbers CAPES-001, PRINT 88887.581726/2020-00]; and the Instituto Serrapilheira [grant number Serra-1708-15285].

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

CRedit Author Contribution

Bárbara Fernandes Pinto: Conceptualization, Resources, Formal analysis, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—original draft, Writing—review & editing. **Lorena Natasha Brito Ribeiro:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Writing—review & editing. **Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira da Silva:** Formal analysis, Methodology. **Camila Simões Freitas:** Methodology. **Lucas Kraemer:** Methodology. **Fabrcio Marcus Silva Oliveira:** Investigation, Methodology. **Marianna Carvalho Clímaco:** Methodology. **Flávio Afonso Gonçalves Mourão:** Formal analysis, Methodology. **Gabryella**

Soares Pinheiro dos Santos: Methodology. **Samantha Ribeiro Béla:** Methodology. **Isabella Luísa da Silva Gurgel:** Methodology. **Fábio de Lima Leite:** Investigation. **Anselmo Gomes de Oliveira:** Investigation. **Maura Regina Silva da Páscoa Vilela:** Investigation. **Onésia Cristina Oliveira-Lima:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—original draft. **Frederico Marianetti Soriani:** Investigation. **Ricardo Toshio Fujiwara:** Investigation. **Alexander Birbrair:** Investigation, Funding acquisition, Writing—original draft. **Remo Castro Russo:** Formal analysis, Supervision, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review & editing. **Juliana Carvalho-Tavares:** Conceptualization, Resources, Data curation, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review & editing.

Ethics Approval

The present study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committees at the Federal University of Minas Gerais (CEUA – UFMG; protocol number 82/2017).

Acknowledgements

We are grateful to Dr D.C. Medeiros for his help on fieldwork and Dr. M.F.D. Moraes for the access to the Center for Technological and Research in Magneto-Resonance (CTPMag), Electrical Engineering Graduate Program, Federal University of Minas Gerais – UFMG, Brazil. We would also like to thank Soniclear® (São Paulo, SP, Brazil) for the kind donation of nebulizers.

Abbreviations

BALF, bronchoalveolar lavage fluid; BBB, blood–brain barrier; Cdyn, dynamic compliance; CNS, central nervous system; Cpk, peak of compliance; DLS, dynamic light-scattering; DMF, dimethyl fumarate; d.p.i., day post-induction; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; FRC, functional residual capacity; H&E, hematoxylin and eosin; i.p., intraperitoneal; MMF, monomethyl fumarate; MOG_{35–55}, myelin oligodendrocyte glycoprotein 35–55; MS, multiple sclerosis; RI, lung resistance; SLN, solid lipid nanoparticle; Treg, T regulatory lymphocyte; XRD, X-ray diffraction.

References

- Dendrou, C.A., Fugger, L. and Friese, M.A. (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 545–558, <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Mäurer, M., Comi, G., Freedman, M.S., Kappos, L., Olsson, T.P., Wolinsky, J.S. et al. (2016) Multiple sclerosis relapses are associated with increased fatigue and reduced health-related quality of life - a post hoc analysis of the TEMSO and TOWER studies. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **7**, 33–40, <https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.02.012>
- Nuro-Gyina, P.K., Rieser, E.L., Granitto, M.C., Pei, W., Liu, Y., Lee, P.W. et al. (2016) Regulation of effector function of CNS autoreactive CD4 T cells through inhibitory receptors and IL-7R α . *J. Neuroinflammation* **13**, 302, <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0768-3>
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A. and Edan, G. (2016) Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)* **172**, 3–13, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.006>
- Torkildsen, Ø., Myhr, K.M. and Bø, L. (2016) Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *Eur. J. Neurol.* **23**, 18–27, <https://doi.org/10.1111/ene.12883>
- Han, R., Xiao, J., Zhai, H. and Hao, J. (2016) Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages. *J. Neuroinflammation* **13**, 97, <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0559-x>
- Burness, C.B. and Deeks, E.D. (2014) Dimethyl fumarate: a review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *CNS Drugs* **28**, 373–387, <https://doi.org/10.1007/s40263-014-0155-5>
- Linker, R.A. and Haghikia, A. (2016) Dimethyl fumarate in multiple sclerosis: latest developments, evidence and place in therapy. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **7**, 198–207, <https://doi.org/10.1177/2040622316653307>
- Phillips, J.T. and Fox, R.J. (2013) BG-12 in multiple sclerosis. *Semin. Neurol.* **33**, 56–65, <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343796>
- Werdenberg, D., Joshi, R., Wolfram, S., Merkle, H.P. and Langguth, P. (2003) Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharm. Drug Dispos.* **24**, 259–273, <https://doi.org/10.1002/bdd.364>
- Mrowietz, U., Christophers, E. and Altmeyer, P. (1999) Treatment of severe psoriasis with fumaric acid esters: scientific background and guidelines for therapeutic use. The German Fumaric Acid Ester Consensus Conference. *Br. J. Dermatol.* **141**, 424–429
- Al-Khamis, F.A. (2016) The use of immune modulating drugs for the treatment of multiple sclerosis. *Neurosciences* **21**, 4–9, <https://doi.org/10.17712/nsj.2016.1.20150252>
- Phillips, J.T., Selmaj, K., Gold, R., Fox, R.J., Havrdova, E., Giovannoni, G. et al. (2015) Clinical significance of gastrointestinal and flushing events in patients with multiple sclerosis treated with delayed-release dimethyl fumarate. *Int. J. MS Care* **17**, 236–243, <https://doi.org/10.7224/1537-2073.2014-069>
- Eriksson, I., Cars, T., Piehl, F., Malmström, R.E., Wettermark, B. and von Euler, M. (2018) Persistence with dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a population-based cohort study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **74**, 219–226, <https://doi.org/10.1007/s00228-017-2366-4>

- 15 Gold, R., Kappos, L., Arnold, D.L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K. et al. (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1098–1107, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1114287>
- 16 Fox, R.J., Miller, D.H., Phillips, J.T., Hutchinson, M., Havrdova, E., Kita, M. et al. (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1087–1097, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206328>
- 17 Wissing, S.A., Kayser, O. and Müller, R.H. (2004) Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **56**, 1257–1272, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.002>
- 18 Gupta, S., Kesarla, R., Chotai, N., Misra, A. and Omri, A. (2017) Systematic approach for the formulation and optimization of solid lipid nanoparticles of efavirenz by high pressure homogenization using design of experiments for brain targeting and enhanced bioavailability. *BioMed Res. Int.* **2017**, 5984014, <https://doi.org/10.1155/2017/5984014>
- 19 Lochhead, J.J. and Thorne, R.G. (2012) Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 614–628, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002>
- 20 Fox, R.J. and Cohen, J.A. (2001) Multiple sclerosis: the importance of early recognition and treatment. *Cleve. Clin. J. Med.* **68**, 157–171, <https://doi.org/10.3949/ccjm.68.2.157>
- 21 Noyes, K. and Weinstock-Guttman, B. (2013) Impact of diagnosis and early treatment on the course of multiple sclerosis. *Am. J. Manag. Care* **19**, s321–s331
- 22 Pouzol, L., Piali, L., Bernard, C.C., Martinic, M.M., Steiner, B. and Clozel, M. (2019) Therapeutic potential of ponesimod alone and in combination with dimethyl fumarate in experimental models of multiple sclerosis. *Innov. Clin. Neurosci.* **16**, 22–30
- 23 Schulze-Topphoff, U., Varrin-Doyer, M., Pekarek, K., Spencer, C.M., Shetty, A., Sagan, S.A. et al. (2016) Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nr1f2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 4777–4782, <https://doi.org/10.1073/pnas.1603907113>
- 24 Mondal, S., Rangasamy, S.B., Ghosh, S., Watson, R.L. and Pahan, K. (2017) Nebulization of RNS60, a physically-modified saline, attenuates the adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in mice: implications for multiple sclerosis therapy. *Neurochem. Res.* **42**, 1555–1570, <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2214-z>
- 25 Bernardes, D., Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Karmally, S., Dellarole, A., Carvalho-Tavares, J. et al. (2016) Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* **136**, 63–73, <https://doi.org/10.1111/jnc.13354>
- 26 Bernardes, D., Oliveira-Lima, O.C., Silva, T.V., Faraco, C.C., Leite, H.R., Juliano, M.A. et al. (2013) Differential brain and spinal cord cytokine and BDNF levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise. *J. Neuroimmunol.* **264**, 24–34, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.08.014>
- 27 Brambilla, R., Morton, P.D., Ashbaugh, J.J., Karmally, S., Lambertsen, K.L. and Bethea, J.R. (2014) Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia* **62**, 452–467, <https://doi.org/10.1002/glia.22616>
- 28 dos Santos, A.C., Barsante, M.M., Arantes, R.M., Bernard, C.C., Teixeira, M.M. and Carvalho-Tavares, J. (2005) CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis—an intravital microscopy study. *J. Neuroimmunol.* **162**, 122–129, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.01.020>
- 29 Bittner, S., Afzali, A.M., Wiendl, H. and Meuth, S.G. (2014) Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35–55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J. Vis. Exp.* 1–5, <https://doi.org/10.3791/51275>
- 30 Xiao, R., Bergin, S.M., Huang, W., Mansour, A.G., Liu, X., Judd, R.T. et al. (2019) Enriched environment regulates thymocyte development and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Brain Behav. Immun.* **75**, 137–148, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.09.028>
- 31 Saria, A. and Lundberg, J.M. (1983) Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J. Neurosci. Methods* **8**, 41–49, [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(83\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0165-0270(83)90050-X)
- 32 Kanayama, M., He, Y.W. and Shinohara, M.L. (2015) The lung is protected from spontaneous inflammation by autophagy in myeloid cells. *J. Immunol.* **194**, 5465–5471, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403249>
- 33 Thati, S., Kuehl, C., Hartwell, B., Sestak, J., Siahaan, T., Forrest, M.L. et al. (2015) Routes of administration and dose optimization of soluble antigen arrays in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Pharm. Sci.* **104**, 714–721, <https://doi.org/10.1002/jps.24272>
- 34 Bauomy, A.A. (2020) Zinc oxide nanoparticles and L-carnitine effects on neuro-schistosomiasis mansonii induced in mice. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **27**, 18699–18707, <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08356-5>
- 35 de Oliveira, R.B., Graham, B., Howlett, M.C., Gravina, F.S., Oliveira, M.W., Imtiaz, M.S. et al. (2010) Ketamine anesthesia helps preserve neuronal viability. *J. Neurosci. Methods* **189**, 230–232, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.029>
- 36 Ebrahimi, M., Khoushnoud, M.J. and Zia-Behbahani, M. (2018) Effect of vitamins B(1), B(6) and B(12) (Neurobion) on diisopropylfluorophosphate-induced delayed neuropathy in mice. *Iranian J. Pharm. Res.* **17**, 1116–1124
- 37 Campa, C.C., Silva, R.L., Margaria, J.P., Pirali, T., Mattos, M.S., Kraemer, L.R. et al. (2018) Inhalation of the prodrug PI3K inhibitor CL27c improves lung function in asthma and fibrosis. *Nat. Commun.* **9**, 5232, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07698-6>
- 38 Russo, R.C., Savino, B., Mirolo, M., Buracchi, C., Germano, G., Anselmo, A. et al. (2018) The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2(+) and CCR5(+) IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **314**, L1010–L1025, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00233.2017>
- 39 Lacerda-Queiroz, N., Lima, O.C., Carneiro, C.M., Vilela, M.C., Teixeira, A.L., Teixeira-Carvalho, A. et al. (2011) Plasmodium berghei NK65 induces cerebral leukocyte recruitment in vivo: an intravital microscopic study. *Acta Trop.* **120**, 31–39, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.020>
- 40 Magnon, C., Hall, S.J., Lin, J., Xue, X., Gerber, L., Freedland, S.J. et al. (2013) Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* **341**, 1236361, <https://doi.org/10.1126/science.1236361>

- 41 Tavares, L.P., Garcia, C.C., Vago, J.P., Queiroz-Junior, C.M., Galvão, I., David, B.A. et al. (2016) Inhibition of phosphodiesterase-4 during pneumococcal pneumonia reduces inflammation and lung injury in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **55**, 24–34, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-00830C>
- 42 Harrison, M., O'Brien, A., Adams, L., Cowin, G., Ruitenbergh, M.J., Sengul, G. et al. (2013) Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *Neuroimage* **68**, 22–29, <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.11.048>
- 43 Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- 44 Joshi, A.S., Patel, H.S., Belgamwar, V.S., Agrawal, A. and Tekade, A.R. (2012) Solid lipid nanoparticles of ondansetron HCl for intranasal delivery: development, optimization and evaluation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **23**, 2163–2175, <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4702-7>
- 45 Nongonierma, A.B., Ablrava, M., Fenelon, M.A. and Kilcawley, K.N. (2009) Evaluation of two food grade proliposomes to encapsulate an extract of a commercial enzyme preparation by microfluidization. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3291–3297, <https://doi.org/10.1021/jf803367b>
- 46 Thompson, A.K. and Singh, H. (2006) Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *J. Dairy Sci.* **89**, 410–419, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72105-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72105-1)
- 47 Thiessen, J.D., Zhang, Y., Zhang, H., Wang, L., Buist, R., Del Bigio, M.R. et al. (2013) Quantitative MRI and ultrastructural examination of the cuprizone mouse model of demyelination. *NMR Biomed.* **26**, 1562–1581, <https://doi.org/10.1002/nbm.2992>
- 48 Yu, O., Steibel, J., Mauss, Y., Guignard, B., Eclancher, B., Chambron, J. et al. (2004) Remyelination assessment by MRI texture analysis in a cuprizone mouse model. *Magn. Reson. Imaging* **22**, 1139–1144, <https://doi.org/10.1016/j.mri.2004.08.017>
- 49 Odoardi, F., Sie, C., Streyll, K., Ulaganathan, V.K., Schläger, C., Lodygin, D. et al. (2012) T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature* **488**, 675–679, <https://doi.org/10.1038/nature11337>
- 50 Liebner, S., Dijkhuizen, R.M., Reiss, Y., Plate, K.H., Agalliu, D. and Constantin, G. (2018) Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* **135**, 311–336, <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- 51 Linker, R.A., Weller, C., Lühder, F., Mohr, A., Schmidt, J., Knauth, M. et al. (2008) Liposomal glucocorticosteroids in treatment of chronic autoimmune demyelination: long-term protective effects and enhanced efficacy of methylprednisolone formulations. *Exp. Neurol.* **211**, 397–406, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.02.005>
- 52 Schmidt, J., Gold, R., Schönrock, L., Zettl, U.K., Hartung, H.P. and Toyka, K.V. (2000) T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain* **123**, 1431–1441, <https://doi.org/10.1093/brain/123.7.1431>
- 53 La Mantia, L., Di Pietrantonj, C., Rovaris, M., Rigon, G., Frau, S., Berardo, F. et al. (2016) Interferons-beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **11**, CD009333, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009333.pub3>
- 54 Ratchford, J.N., Brock-Simmons, R., Augsburg, A., Steele, S.U., Mohn, K., Rhone, M. et al. (2014) Multiple sclerosis symptom recrudescence at the end of the natalizumab dosing cycle. *Int. J. MS Care* **16**, 92–98, <https://doi.org/10.7224/1537-2073.2013-017>
- 55 Glanz, B.I., Musallam, A., Rintell, D.J., Chitnis, T., Weiner, H.L. and Healy, B.C. (2014) Treatment satisfaction in multiple sclerosis. *Int. J. MS Care* **16**, 68–75, <https://doi.org/10.7224/1537-2073.2013-021>
- 56 Al-Jaderi, Z. and Maghazachi, A.A. (2016) Utilization of dimethyl fumarate and related molecules for treatment of multiple sclerosis, cancer, and other diseases. *Front. Immunol.* **7**, 278, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00278>
- 57 Parodi, B., Rossi, S., Morando, S., Cordano, C., Bragoni, A., Motta, C. et al. (2015) Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. *Acta Neuropathol.* **130**, 279–295, <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1422-3>
- 58 Demir, S., Heckers, S., Pedreiturria, X., Hess, D., Trampe, A.K., Chan, A. et al. (2015) Low dose fumaric acid esters are effective in a mouse model of spontaneous chronic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **285**, 16–21, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.05.010>
- 59 Kumar, P., Sharma, G., Gupta, V., Kaur, R., Thakur, K., Malik, R. et al. (2018) Preclinical explorative assessment of dimethyl fumarate-based biocompatible nanolipoidal carriers for the management of multiple sclerosis. *ACS Chem. Neurosci.* **9**, 1152–1158, <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00519>
- 60 Linker, R.A., Lee, D.H., Ryan, S., van Dam, A.M., Conrad, R., Bista, P. et al. (2011) Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* **134**, 678–692, <https://doi.org/10.1093/brain/awq386>
- 61 Schilling, S., Goelz, S., Linker, R., Luehder, F. and Gold, R. (2006) Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clin. Exp. Immunol.* **145**, 101–107, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03094.x>
- 62 Yadav, S.K., Ito, N., Soin, D., Ito, K. and Dhib-Jalbut, S. (2021) Dimethyl fumarate suppresses demyelination and axonal loss through reduction in pro-inflammatory macrophage-induced reactive astrocytes and complement C3 deposition. *J. Clin. Med.* **10**, 857, <https://doi.org/10.3390/jcm10040857>
- 63 Traub, J., Traffehn, S., Ochs, J., Häusser-Kinzel, S., Stephan, S., Scannevin, R. et al. (2019) Dimethyl fumarate impairs differentiated B cells and fosters central nervous system integrity in treatment of multiple sclerosis. *Brain Pathol.* **29**, 640–657, <https://doi.org/10.1111/bpa.12711>
- 64 Gomes, J.R., Cabrito, I., Soares, H.R., Costelha, S., Teixeira, A., Wittelsberger, A. et al. (2018) Delivery of an anti-transferrin Nanobody to the brain through intranasal administration reveals transferrin expression and secretion by motor neurons. *J. Neurochem.* **145**, 393–408, <https://doi.org/10.1111/jnc.14332>
- 65 Shobo, A., Pamreddy, A., Kruger, H.G., Makatini, M.M., Naicker, T., Govender, T. et al. (2018) Enhanced brain penetration of pretomanid by intranasal administration of an oil-in-water nanoemulsion. *Nanomedicine* **13**, 997–1008, <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0365>
- 66 Marijon, A., Bonnot, G., Fourier, A., Bringer, C., Lavoignat, A., Gagnieu, M.C. et al. (2014) Efficacy of intranasal administration of artesunate in experimental cerebral malaria. *Malar. J.* **13**, 501, <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-501>
- 67 Meredith, M.E., Salameh, T.S. and Banks, W.A. (2015) Intranasal delivery of proteins and peptides in the treatment of neurodegenerative diseases. *AAPS J.* **17**, 780–787, <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9719-7>
- 68 Comabella, M. and Khoury, S.J. (2012) Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **142**, 2–8, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.03.004>

- 69 Hafler, D.A. (2004) Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **113**, 788–794, <https://doi.org/10.1172/JCI21357>
- 70 Zeng, Y., Gu, B., Ji, X., Ding, X., Song, C. and Wu, F. (2007) Sinomenine, an antirheumatic alkaloid, ameliorates clinical signs of disease in the Lewis rat model of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1438–1444, <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1438>
- 71 Kuersten, S., Kostova-Bales, D.A., Frenzel, L.P., Tigno, J.T., Tary-Lehmann, M., Angelov, D.N. et al. (2007) MP4- and MOG:35–55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J. Neuroimmunol.* **189**, 31–40, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.06.016>
- 72 Wang, N., Liang, S., Jin, J., Fang, L., Ma, Q., Wang, X. et al. (2019) CD226 attenuates Treg suppressive capacity via CTLA-4 and TIGIT during EAE. *Immunol. Res.* **67**, 486–496, <https://doi.org/10.1007/s12026-019-09112-9>
- 73 Sambucci, M., Gargano, F., De Rosa, V., De Bardi, M., Picozza, M., Placido, R. et al. (2018) FoxP3 isoforms and PD-1 expression by T regulatory cells in multiple sclerosis. *Sci. Rep.* **8**, 3674, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21861-5>
- 74 Kimura, K., Hohjoh, H. and Yamamura, T. (2018) The role of exosomal microRNAs in disruption of regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *J. Exp. Neurosci.* **12**, 1179069518764892, <https://doi.org/10.1177/1179069518764892>
- 75 Gross, C.C., Schulte-Mecklenbeck, A., Klinsing, S., Posevitz-Fejfar, A., Wiendl, H. and Klotz, L. (2016) Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **3**, e183, <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000000183>
- 76 Tsou, Y.H., Zhang, X.Q., Zhu, H., Syed, S. and Xu, X. (2017) Drug delivery to the brain across the blood-brain barrier using nanomaterials. *Small* **13**, 1–17, <https://doi.org/10.1002/sml.201701921>
- 77 Alvarez, J.I., Cayrol, R. and Prat, A. (2011) Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 252–264, <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2010.06.017>
- 78 Bennett, J., Basivireddy, J., Kollar, A., Biron, K.E., Reickmann, P., Jefferies, W.A. et al. (2010) Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. *J. Neuroimmunol.* **229**, 180–191, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.08.011>
- 79 Smorodchenko, A., Wuferfel, J., Pohl, E.E., Vogt, J., Tysiak, E., Glumm, R. et al. (2007) CNS-irrelevant T-cells enter the brain, cause blood-brain barrier disruption but no glial pathology. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 1387–1398, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05792.x>
- 80 Dopkins, N., Nagarkatti, P.S. and Nagarkatti, M. (2018) The role of gut microbiome and associated metabolome in the regulation of neuroinflammation in multiple sclerosis and its implications in attenuating chronic inflammation in other inflammatory and autoimmune disorders. *Immunology* **154**, 178–185, <https://doi.org/10.1111/imm.12903>
- 81 Kunze, R., Urrutia, A., Hoffmann, A., Liu, H., Helluy, X., Pham, M. et al. (2015) Dimethyl fumarate attenuates cerebral edema formation by protecting the blood-brain barrier integrity. *Exp. Neurol.* **266**, 99–111, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.022>
- 82 Brück, J., Glocova, I., Geisel, J., Kellerer, C., Röcken, M. and Ghoreschi, K. (2018) Dimethyl fumarate-induced IL-17(low) IFN- γ (low) IL-4(+) Th cells protect mice from severe encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **48**, 1588–1591, <https://doi.org/10.1002/eji.201747435>
- 83 Wattjes, M.P., Rovira, À., Miller, D., Yousry, T.A., Sormani, M.P., de Stefano, M.P. et al. (2015) Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis—establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 597–606
- 84 Smith, P.A., Schmid, C., Zurbrugg, S., Jivkov, M., Doelemeyer, A., Theil, D. et al. (2018) Fingolimod inhibits brain atrophy and promotes brain-derived neurotrophic factor in an animal model of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **318**, 103–113, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.02.016>
- 85 Gass, A., Rocca, M.A., Agosta, F., Ciccarelli, O., Chard, D., Valsasina, P. et al. (2015) MRI monitoring of pathological changes in the spinal cord in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **14**, 443–454, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70294-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70294-7)
- 86 Warntjes, J.B.M., Tisell, A., Håkansson, I., Lundberg, P. and Ernerudh, J. (2018) Improved precision of automatic brain volume measurements in patients with clinically isolated syndrome and multiple sclerosis using edema correction. *Am. J. Neuroradiol.* **39**, 296–302, <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5476>
- 87 Kuehl, C., Thati, S., Sullivan, B., Sestak, J., Thompson, M., Siahaan, T. et al. (2017) Pulmonary administration of soluble antigen arrays is superior to antigen in treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Pharm. Sci.* **106**, 3293–3302, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.06.008>
- 88 Alrashdan, Y.A., Alkhouri, H., Chen, E., Lalor, D.J., Poniris, M., Henness, S. et al. (2012) Asthmatic airway smooth muscle CXCL10 production: mitogen-activated protein kinase JNK involvement. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, L1118–L1127, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00232.2011>
- 89 Grzegorzewska, A.P., Seta, F., Han, R., Czajka, C.A., Makino, K., Stawski, L. et al. (2017) Dimethyl fumarate ameliorates pulmonary arterial hypertension and lung fibrosis by targeting multiple pathways. *Sci. Rep.* **7**, 41605, <https://doi.org/10.1038/srep41605>
- 90 Seidel, P. and Roth, M. (2013) Anti-inflammatory dimethylfumarate: a potential new therapy for asthma? *Mediators Inflamm.* **2013**, 875403, <https://doi.org/10.1155/2013/875403>
- 91 Wolter, A., Müller, M., Völker, B., Gehring, M., Caldaroni, F., Kapp, A. et al. (2012) Cutaneous and pulmonary sarcoidosis. Successful therapy with fumaric acid esters. *Hautarzt* **63**, 808–811, <https://doi.org/10.1007/s00105-012-2386-z>
- 92 Ding, W., Lin, H., Hong, X., Ji, D. and Wu, F. (2020) Poloxamer 188-mediated anti-inflammatory effect rescues cognitive deficits in paraquat and maneb-induced mouse model of Parkinson's disease. *Toxicology* **436**, 152437, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152437>
- 93 Riehm, J.J., Wang, L., Ghadge, G., Teng, M., Correa, A.M., Marks, J.D. et al. (2018) Poloxamer 188 decreases membrane toxicity of mutant SOD1 and ameliorates pathology observed in SOD1 mouse model for ALS. *Neurobiol. Dis.* **115**, 115–126, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.03.014>
- 94 Harting, M.T., Jimenez, F., Kozar, R.A., Moore, F.A., Mercer, D.W., Hunter, R.L. et al. (2008) Effects of poloxamer 188 on human PMN cells. *Surgery* **144**, 198–203, <https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.05.001>