Universidade de São Paulo
Faculdade De Medicina De Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

**Importância da via de sinalização dependente de ERK5 na
diferenciação de linfócitos Th17 e Treg e no
desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental**

Douglas da Silva Prado

Ribeirão Preto
2020

DOUGLAS DA SILVA PRADO

**Importância da via de sinalização dependente de ERK5 na diferenciação
de linfócitos Th17 e Treg e no desenvolvimento da
encefalomielite autoimune experimental**

**Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, da Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto, da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas.**

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: José Carlos Farias Alves Filho

Ribeirão Preto

2020

**AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha Catalográfica

Prado, Douglas da Silva

**Importância da via de sinalização dependente de ERK5 na diferenciação de linfócitos Th17 e Treg e no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental
Ribeirão Preto, 2020**

164p.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: José Carlos Farias Alves Filho

Palavras-chave: ERK5, Treg, Th17, EAE, TGF- β .

FOLHA DE APROVAÇÃO

Douglas da Silva Prado

Importância da via de sinalização dependente de ERK5 na diferenciação de linfócitos Th17 e Treg e no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Presidente da Banca: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Prof^a. Dra. Sabrina Francesca de Souza Lisboa Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara Instituição: ICB-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso Instituição: UNIFESP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq.

Dedico este trabalho a minha
família, em especial aos meus
pais, Geova e Clarice.

Agradecimentos

Aos meus pais Geova e Clarice, pela educação, incentivo e por me ensinarem a importância da família na formação pessoal. Muito obrigado por tudo e desculpa por todo esse tempo longe. Vocês são os melhores pais do mundo.

Aos meus irmãos Lindaura, Giliard, Rafael e Cíntia, pela amizade e por sempre estarem dispostos a me ajudar, amo vocês. Vocês me ajudam a continuar.

As minhas sobrinhas Isadora e Beatriz, eu amo vocês apesar de conhecê-las pouco.

A minha noiva Andreza, pelo amor, carinho e companheirismo durante todo esse tempo. Eu te amo.

Ao Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho, por ter me aceitado no seu grupo e pela orientação.

Aos professores Fernando e Thiago Cunha, por terem ajudado no desenvolvimento desse projeto.

Aos professores Sabrina, Niels e Basso por terem aceitado a indicação para participar da minha banca examinadora.

Aos meus colegas do laboratório de inflamação e dor com quem convivi durante esses 6 anos e meio, Alexandre Kanashiro, Alexandre Lopes, Alexandre Maganim, Amanda, André, Andressa Freitas, Andreza Urba, Annie, Atlante, Ayda, Bárbara, Beatriz, Bruno, Caio, Carol, Claudinha, César, Daniele, David Cólón, David Ferreira, Diego, Eduardo, Elidianne, Erivan, Fábio, Fernanda, Flávia, Flávio, Gabi, Gabriel, Guilherme, Isaac, Isadora, Jaqueline, Jéssica, João Paulo, Juliana, Kallil, Larissa, Leticia, Marcela, Marcelo, Marcos, Maria Cláudia, Mika, Miriam, Natália, Paula Barbim, Paula Viacava, Paulo, Priscila, Rangel, Rafaela, Raphael Ferreira, Raphael Peres, Rayssa, Ricardo, Rosy, Stella, Taty, Thainá, Timna, Vanessa e Verena. Desculpa aos que eu esqueci de citar o nome.

Aos meus amigos Flávio, Gabriel, Marcos, e Thainá pela amizade e excelentes momentos juntos.

Aos meus amigos da pós-graduação Alice, Mayara e Nicole pelo convívio e momentos felizes com vocês.

Aos técnicos do laboratório Marquinhos, Ieda, Serginho, Ju, Kátia, Diva e Marcela pelo apoio técnico.

Aos meus amigos, Coqueiro, Gibran Kallil, Lixo e Seiton por termos criados um bom clã de Ragnarok.

Aos meus amigos da graduação Anderson Ferreira, Anderson Wagner, Bruno e Jadiel, pela amizade e por terem feito que a graduação tenha sido menos desagradável.

Ao professor Enilton Camargo, pelas aulas de farmacologia na graduação. Eu decidi fazer pesquisa devido as suas aulas.

Ao meu amigo Carlos, pela amizade e por ter incentivado e ajudado nos meus estudos desde quando eu era criança

Ao meu amigo Vinícius, pela nossa amizade da infância e companheirismo que duram até hoje.

As agências CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (nº processo: 2016/05377-3), fazendo com que eu tivesse uma vida menos miserável longe da casa de meus pais.

“Os que no regime burguês trabalham não
lucram e os que lucram não trabalham”

Friedrich Engels

PRADO, D.S. Importância da via de sinalização dependente de ERK5 na diferenciação de linfócitos Th17 e Treg e no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental. 2020. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Resumo

ERK5 (quinase regulada por sinal extracelular 5) é um membro atípico da família das MAPK, uma vez que tem função de regular a atividade de fatores de transcrição por ligação proteína-proteína, de forma independente da sua função quinase. De forma interessante, ERK5 é ativado em diferentes tipos celulares por TGF- β , o qual modula a diferenciação de linfócitos T reguladores (Treg) e Th17. Esses dois subtipos de linfócitos T CD4 são responsáveis por modular o desenvolvimento de doenças autoimunes. Enquanto as Treg controlam a homeostasia e manutenção da tolerância imunológica, os linfócitos Th17 são as células efetoras auto-reativas que orquestram o dano tecidual. Desta forma, ERK5 poderia ser ativado por TGF- β também em linfócitos Treg e Th17 e assim, modular a diferenciação destas células, as quais são importantes para o desenvolvimento de um modelo animal de doença autoimune, como a EAE (encefalomielite autoimune experimental). Assim, a função de ERK5 na diferenciação de células Treg e Th17 e a participação de TGF- β para ativação e efeitos de ERK5 foram investigados por meio de cultura de linfócitos T CD4 *naïve*. Além disso, foi avaliado o papel de ERK5 no modelo de EAE, o qual foi induzido pela injeção subcutânea de uma emulsão contendo MOG₃₅₋₅₅. Nesse estudo, foi demonstrado que TGF- β induziu a fosforilação de ERK5 em células Treg e Th17. Além disso, a inibição dessa MAPK ou sua deleção reduziu a diferenciação de linfócitos Treg e aumentou a de Th17, um processo que foi independente da sinalização de MEK5 ou da atividade quinase de ERK5. A

citocina TGF- β , por sua vez, mediou os efeitos promovidos por ERK5, bem como a translocação nuclear dessa MAPK. Desta forma, nossos dados sugerem que a localização nuclear de ERK5 deve ser importante para a sua função na diferenciação de células Treg e Th17. Por fim, a deficiência de ERK5 em linfócitos T CD4 levou a um maior desenvolvimento da EAE, o que foi associado a menor frequência de células Treg e maior de Th17. Portanto, este estudo demonstra um papel inédito de ERK5 na modulação da diferenciação de linfócitos Treg e Th17 e no desenvolvimento da EAE, sendo um possível alvo farmacológico no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças autoimunes.

Palavras-chave: ERK5, Treg, Th17, EAE, TGF- β .

PRADO, D.S. Role of the ERK5-dependent signaling pathway in the differentiation of Th17 and Treg cells and in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. 2020. Thesis (PhD). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Abstract

ERK5 (extracellular-signal-regulated kinase 5) is an atypical member of MAPK family, because it works as a kinase and can also regulate transcription factor activity by protein-protein interaction, which it happens in an independent way of your kinase function. Interestingly, ERK5 is activated in different cell types by TGF- β , which modulates Treg and Th17 cell differentiation. These two CD4 T cells subtypes are responsible for modulating the development of autoimmune diseases. Thus, while Treg cells control homeostasis and maintenance of immune tolerance, Th17 cells are self-reactive effector cells that orchestrate tissue damage. In addition, ERK5 also could be activated by TGF- β in T lymphocytes Treg and Th17 and then would modulate the differentiation of these cells, which are important for the development of a mouse model of autoimmune disease, called EAE, (experimental autoimmune encephalomyelitis). Thus, the role of ERK5 on Treg and Th17 differentiation, as well as the role of TGF- β on ERK5 activation and effects were performed by naive CD4 T cells culture. Furthermore, it was investigated the function of ERK5 on EAE model, which was induced by an injection of an emulsion containing MOG₃₅₋₅₅. In this study, we have shown that TGF- β induced ERK5 phosphorylation in Treg and Th17 cells. Moreover, ERK5 inhibition or deletion reduced Treg and increased Th17 differentiation. Strikingly, this process was not dependent of MEK5 signaling or ERK5 kinase activity. On the other hand, the cytokine TGF- β mediated ERK5 effects, as well its nuclear translocation. Thus, our data suggest that ERK5 nuclear localization is important to its function on Treg and Th17 differentiation.

Finally, ERK5-deficient mice displayed more severe EAE, which was associated with lower Treg frequency and higher Th17. Therefore, this study has shown a new role of ERK5 on Treg and Th17 differentiation and in the EAE development, suggesting that ERK5 could be a possible pharmacological target to the development of new therapies for the treatment of autoimmune diseases.

Key-words: ERK5, Treg, Th17, EAE, TGF- β .

Índice de Figuras

Figura 1. O modelo EAE apresenta infiltrado de leucócitos e desmielinização.....	4
Figura 2. Diferenciação de linfócitos T CD4.....	8
Figura 3. A Estrutura de ERK5.....	13
Figura 4. Ativação e translocação nuclear de ERK5.....	15
Figura 5. ERK5 encontra-se fosforilada em células Treg e Th17.....	34
Figura 6. A inibição de MEK5 não altera a diferenciação de células Treg.....	35
Figura 7. A inibição de ERK5 reduz a diferenciação de células Treg.....	36
Figura 8. A inibição de ERK5 reduz a sua fosforilação em células Treg.....	37
Figura 9. A inibição de MEK5 não altera a diferenciação de células Th17.....	38
Figura 10. A inibição de ERK5 aumenta a diferenciação de células Th17.....	38
Figura 11. A inibição de ERK5 reduz a sua fosforilação em células Th17.....	39
Figura 12. A inibição de ERK5 aumenta a frequência de células IL-17A ⁺ IL-17F ⁺	41
Figura 13. A inibição de ERK5 não altera a expressão de IL-23R.....	42
Figura 14. A inibição da atividade quinase de ERK5 não altera a diferenciação de células Treg.....	43
Figura 15. A inibição da atividade quinase de ERK5 não altera a diferenciação de células Th17.....	44
Figura 16. Geração de animais deficientes para ERK5 em linfócitos T.....	45
Figura 17. A deficiência de ERK5 não altera o desenvolvimento homeostático de linfócitos T.....	46
Figura 18. A deficiência de ERK5 não altera a população de células <i>naïve</i> , memória, Treg ou Th17 em condições basais.....	47
Figura 19. ERK5 não é importante para a proliferação de linfócitos T CD4.....	48
Figura 20. A deficiência de ERK5 reduz a diferenciação de células Treg.....	49
Figura 21. A deficiência de ERK5 aumenta a diferenciação de células Th17.....	50
Figura 22. A deficiência de ERK5 não altera a diferenciação de células Th1 ou Th2.....	51
Figura 23. A deficiência de ERK5 aumenta a expressão de <i>Il17a</i> , <i>Il22</i> , <i>Il23r</i> e <i>Rorc</i>	52
Figura 24. A deficiência de ERK5 reduz a expressão de <i>Foxp3</i>	52
Figura 25. A deficiência de ERK5 aumenta a produção de IL-17, IL-22 e GM-CSF, mas não altera de IFN γ e IL-13.....	53

Figura 26. A deficiência de ERK5 em linfócitos T aumenta a gravidade da EAE.....	54
Figura 27. A deficiência de ERK5 em linfócitos T modula diferenciação de linfócitos Treg e Th17 <i>in vivo</i> durante a EAE.....	55
Figura 28. A deficiência de ERK5 em linfócitos T reduz a diferenciação de células Treg e aumenta a de linfócitos Th17 em um ensaio antígeno-específico.....	56
Figura 29. A deficiência de ERK5 em linfócitos T aumenta a expressão de IBA1 durante a EAE.....	57
Figura 30. A deficiência de ERK5 em linfócitos T aumenta a expressão de pSTAT3 durante a EAE.....	58
Figura 31. A deficiência de ERK5 em linfócitos T aumenta a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento da EAE.....	59
Figura 32. TGF- β medeia os efeitos de ERK5 na diferenciação de linfócitos T.....	61
Figura 33. TGF- β induz a fosforilação de ERK5 em linfócitos T.....	62
Figura 34. ERK5 modula a diferenciação induzida por TGF- β 3.....	63
Figura 35. TGF- β 3 induz a fosforilação de ERK5 em linfócitos Th17.....	63
Figura 36. ERK5 encontra-se no núcleo de linfócitos Treg e Th17.....	64
Figura 37. TGF- β medeia a localização nuclear de ERK5.....	65
Figura 38. A inibição de ERK5 reduz a sua translocação para o núcleo.....	66
Figura 39. ERK5 modula a diferenciação de linfócitos Treg e Th17 por um mecanismo dependente da sinalização de TGF- β	74

Sumário

1.	Introdução.....	1
1.1	Esclerose múltipla e EAE.....	1
1.2	Linfócitos T reguladores e Th17.....	6
1.2	ERK5.....	12
2.	Objetivos.....	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
2.2.1.	Avaliar a expressão e fosforilação de ERK5 em linfócitos Treg e Th17	20
2.2.2.	Avaliar o papel de ERK5 na diferenciação de células Treg e Th17	20
2.2.3.	Investigar o impacto da deficiência de ERK5 no desenvolvimento homeostático de linfócitos T CD4	21
2.2.4.	Investigar o papel de ERK5 em linfócitos T CD4 para o desenvolvimento da EAE	21
2.2.5.	Avaliar o papel de TGF- β nos efeitos mediados por ERK5	22
2.2.6.	Avaliar o papel de TGF- β na localização de ERK5 em linfócitos Treg e Th17 ...	22
3.	Material e Métodos.....	24
3.1	Animais.....	24
3.2	Cultura de linfócitos T CD4.....	24
3.3	Ferramentas farmacológicas.....	25
3.4	Marcação extracelular e intracelular para citometria de fluxo.....	26
3.5	Genotipagem.....	27
3.6	Indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	28
3.7	Avaliação da resposta antígeno-específica na EAE.....	28
3.8	ELISA.....	29
3.9	PCR em tempo real.....	29
3.10	Western Blot.....	31
3.11	Fracionamento Nuclear.....	32

3.12	Análise estatística.....	33
4.	Resultados.....	34
5.	Discussão.....	67
6.	Conclusão.....	74
7.	Referências.....	75
8.	Anexos.....	96

1. Introdução

1.1 Esclerose múltipla e EAE

As doenças autoimunes são caracterizadas por uma resposta inflamatória exacerbada com causa desconhecida, que promovem lesões em diferentes órgãos e tecidos. Dentre essas doenças, a esclerose múltipla (EM) caracteriza-se por um processo inflamatório no sistema nervoso central (SNC), levando a desmielinização dos neurônios e intenso infiltrado de leucócitos no sítio da inflamação. Assim, as principais características patológicas são inflamação, desmielinização e dano dos axônios. Quanto a epidemiologia, a EM é predominante em mulheres (cerca de 60%), com manifestação no início da vida adulta (20-30 anos) (LÜNEMANN et al., 2020; TINTORE; VIDAL-JORDANA; SASTRE-GARRIGA, 2019). Além disso, ela pode ser dividida em quatro tipos, os quais são: remitente recorrente (RRMS), primária progressiva (PPMS), secundária progressiva (SPMS) e progressiva recorrente (PRMS), das quais a forma RRMS é a mais comum, acometendo mais de 80% dos indivíduos com EM (LUBLIN, 1996).

O tratamento farmacológico da EM pode ser dividido em três eras: 1993-2003, 2003-2009 e de 2009 até os dias atuais (RANSOHOFF; HAFLER; LUCCHINETTI, 2015). O início da primeira era foi caracterizado pelo uso de IFN- β , que promoveu uma melhora de cerca de 30% no número de recidivas apresentadas pelos pacientes, quando comparado ao grupo que recebeu placebo, tendo sido aprovado pelo FDA em 1993 (JACOBS, 1981). De forma interessante, o IFN- β foi testado em pacientes com EM porque acreditava-se no envolvimento viral na fisiopatologia da EM e era conhecido o efeito antiviral de IFN- α e IFN- β . Outro medicamento importante foi o acetato de glatirâmero (AG), que foi curiosamente descoberto através de estudos que buscavam moléculas similares aos peptídeos utilizados na indução de modelos animais de EM. No entanto, encontrou-se um composto sintético que era capaz de

reduzir o desenvolvimento do modelo animal (TEITELBAUM et al., 1971). Posteriormente, foi demonstrado o efeito protetor de AG em pacientes com EM (JOHNSON et al., 1998).

Apesar dos grandes avanços na terapêutica da EM devido ao uso de IFN- β e AG, parte dos pacientes eram refratários a esses medicamentos. Assim, durante a segunda era foi desenvolvido um anticorpo monoclonal humanizado anti-integrinas $\alpha 4\beta 1$ (natalizumab), que são críticas no processo de migração de linfócitos T para o SNC através da barreira hematoencefálica (BHE) (YEDNOCK et al., 1992). O natalizumab apresentou redução acentuada dos quadros de relapsos (MILLER et al., 2003). No entanto, cerca de 0,1% dos pacientes tratados apresentaram leucoencefalopatia multifocal progressiva, a qual é uma rara infecção cerebral frequentemente fatal (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; TYLER, 2005). O outro medicamento desta era é o fingolimod que atua no receptor de esfingosina-1-fostato (S1P), levando a internalização do receptor e, consequentemente, retendo os linfócitos T nos linfonodos. Estes mecanismos resultam em um quadro de linfopenia e, consequentemente, índices mais baixos de relapsos do que os pacientes tratados com IFN- β . Além disso, uma das grandes vantagens do fingolimod é de ser utilizado por via oral (COHEN et al., 2010).

A terceira geração de drogas para o tratamento da EM caracteriza-se por dois imunomoduladores de uso oral (teriflunomida e dimetil fumarato) e de anticorpos monoclonais contra moléculas importantes na fisiopatologia da EM. Entre os anticorpos, destaca-se os que possuem como alvo os linfócitos B (rituximab/ocrelizumab), ligando-se à molécula CD20, uma vez que apresentaram redução do número de novas lesões em relação ao grupo controle (HAUSER et al., 2008, 2017). Em relação aos imunomoduladores, a teriflunomida é um inibidor da síntese de pirimidinas, inibindo a síntese de RNA e DNA (o que limita seu uso), que apresentou redução do número de lesões em comparação a pacientes controle (LI et al., 2006). O dimetil fumarato possui efeito imunomodulador por um mecanismo de ação que não está bem esclarecido, mas que reduziu o número de pacientes com relapso da doença em relação ao

grupo placebo (FOX et al., 2012; GOLD et al., 2012; KAPPOS et al., 2008). Apesar dessas diversas opções de medicamentos, os efeitos adversos apresentados por eles, bem como a refratariedade de alguns pacientes impulsionam a busca de novas abordagens para o tratamento da EM.

O conhecimento que se tem a respeito de diversos desses medicamentos ou da fisiopatologia da EM foram obtidos inicialmente através dos trabalhos que usaram o principal modelo animal de esclerose múltipla, conhecido como encefalomielite autoimune experimental (EAE) (CONSTANTINESCU et al., 2011). Assim, a EAE possui diversas similaridades, mas também diferenças em relação a EM. Dentre as principais semelhanças encontram-se o fato de animais submetidos a EAE responderem a fármacos utilizados na EM, a sintomatologia e as paridades na fisiopatologia, como o infiltrado de leucócitos no SNC e a desmielinização, ilustrados na figura 1 (CONSTANTINESCU et al., 2011; HART; GRAN; WEISSERT, 2011). Vale salientar que outro fenômeno comum é o *epitope spreading*, que é a diversificação da resposta imune inicial, a qual foi induzida por um único antígeno e, posteriormente, os linfócitos T passam a responder a diferentes antígenos, sendo que esse fenômeno inicia-se no SNC (LEHMANN et al., 1992; MCMAHON et al., 2005). Dentre as principais discrepâncias entre o modelo de EAE e a EM estão o fato da doença ser monofásica na EAE em animais C57BL/6, a linhagem animal mais utilizada, a falta de efetividade de alguns medicamentos na EM que obtiveram êxito na EAE e a óbvia necessidade de imunização em animais para desenvolvimento do modelo (CONSTANTINESCU et al., 2011; HART; GRAN; WEISSERT, 2011).

Figura 1. O modelo EAE apresenta infiltrado de leucócitos e desmielinização. A EAE foi induzida em camundongos por meio da imunização com uma emulsão contendo MOG₃₅₋₅₅ em CFA (Adjuvante completo de Freund) e pelo tratamento com toxina pertussis. As medulas espinhais (região lombar) foram coletadas de animais perfundidos com PBS, sendo posteriormente fixadas com PFA 4% e processadas para a realização de cortes histológicos para serem submetidos à coloração de HE (hematoxilina-eosina) e *luxol fast blue* para mielina após 17 dias da imunização. Modificado de (WEI et al., 2013).

O modelo de EAE tem uma história que tem seu início com os estudos de vacina para raiva realizados por Pasteur. Essa vacina consistia de uma suspensão de medulas espinhais dissecadas de coelhos que foram infectados com um vírus que causava raiva. Foi observado que pacientes que eram vacinados apresentavam uma encefalomielite diferente daquela causada pela raiva. Posteriormente, essa encefalomielite foi também demonstrada após a injeção repetida de tecido neural saudável em macacos, levando ao desenvolvimento de uma resposta autoimune contra antígenos presente no SNC (LINDSEY, 2005). No entanto, a incidência era baixa e era necessária injeções repetidas de tecido neural. De fato, os animais receberam três vezes por semana injeções intramusculares de tecido cerebral, totalizando até 93 injeções. Além disso, dos oito animais utilizados, 2 desenvolveram um encefalomielite desmielinizante, que ocorreu após a 52ª ou 84ª injeção (RIVERS; SCHWENTKER, 1935; RIVERS; SPRUNT; BERY, 1933). Assim, a introdução de um óleo mineral contendo *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizado com o antígeno, levando a formação de uma emulsão, aumentando a resposta

contra o antígeno e consequentemente elevando a incidência e o desenvolvimento da encefalomielite (KABAT; WOLF; BEZER, 1946a, 1946b; MORGAN, 1947; MORRISON, 1947). De forma importante, também foi demonstrado que o uso de uma vacina pertussis e, posteriormente, da toxina pertussis aumentou a incidência da doença, passando a ser usado como adjuvante no modelo animal (LEE; OLITSKY, 1955; MUNOZ; BERNARD; MACKAY, 1984), devido a sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e do aumento da produção de IL-1 β por monócitos inflamatórios, que é uma citocina crítica para o desenvolvimento da EAE (LINTHICUM; MUNOZ; BLASKETT, 1982; RONCHI et al., 2016; SCHIFFENBAUER et al., 2000; SUTTON et al., 2006; YONG; MEININGER; SCOTT LINTHICUM, 1993).

O conhecimento que se tinha até o momento em relação a indução do modelo é que algum antígeno presente no SNC dos animais era o responsável por induzir uma encefalomielite, mas não era conhecido se era apenas um ou vários antígenos que desencadeavam a resposta autoimune. Nesse sentido, os primeiros antígenos demonstrados a induzir uma resposta encefalotogênica foram a proteína básica da mielina (MBP, do inglês *myelin basic protein*) e a proteína de proteolípídeo (PLP, do inglês *proteolipid protein*) (KIES; MURPHY; ALVORD, 1960; OLITSKY; TAL, 1952), sendo que pequenas fragmentos dessas proteínas já eram suficientes para induzir o modelo de EAE (EYLAR et al., 1970). Atualmente, o principal antígeno utilizado para induzir a EAE é glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG, do inglês *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*) (LININGTON et al., 1993), o que é justificado pela característica crônica do modelo de EAE quando utilizado em animais C57BL/6, a principal linhagem utilizada em virtude dos animais geneticamente modificados existentes terem sido realizados nesse *background* genético (MENDEL; DE ROSBO; BEN-NUN, 1995). De forma interessante, quando leucócitos do sangue periférico de pacientes com EM são reestimulados *in vitro* com esses antígenos, foi demonstrado uma maior proliferação

com MOG do que com MBP, PLP e MAG (glicoproteínas associada a mielina, do inglês *Myelin-associated protein*) (DE ROSBO et al., 1993).

O modelo de EAE que consiste na imunização com diferentes peptídeos é conhecido como EAE ativa, em virtude da construção da resposta imune e o desenvolvimento do modelo ocorrerem no mesmo animal. Outro modelo utilizado é a EAE passiva que consiste na transferência de linfócitos T CD4 ativados com o antígeno da imunização, levando a geração de células específicas para antígenos do SNC, para um segundo animal. Assim, o processo de ativação dos linfócitos T acontece em um animal (doador) e o desenvolvimento dos sintomas em outro (receptor) (PATERSON, 1960; STONE, 1961).

1.2 Linfócitos T reguladores e Th17

Apesar da etiologia ser desconhecida, sabe-se que fatores ambientais, genéticos e a desregulação do sistema imune estão relacionados com o desenvolvimento de doenças autoimunes. No sistema imune, as principais células que orquestram esse fenômeno pertencem ao sistema imune adaptativo, como os linfócitos T reguladores (Treg) e linfócitos T *helper* (Th) 17. Enquanto que os linfócitos Tregs são responsáveis pelo controle da homeostasia e tolerância imunológica, os Th17 são células efetoras auto-reativas envolvidas com a patogênese da EM. Desta forma, o controle da homeostasia é perdido em condições inflamatórias, com a alteração do equilíbrio entre linfócitos Treg e Th17 (KNOCHELMANN et al., 2018; KORN et al., 2007a; NOACK; MIOSSEC, 2014).

Durante vários anos foi atribuído aos linfócitos Th1 ou a IL-12 um papel central no desenvolvimento de doença autoimunes, tendo sido demonstrado que isso ocorria pelo uso de animais deficientes para a subunidade P40 (CONSTANTINESCU et al., 1998; LEONARD; WALDBURGER; GOLDMAN, 1995), a qual era compartilhada com a IL-23 (OPPMANN et al., 2000). Posteriormente, animais deficientes para P19 (unidade específica para IL-23)

mostraram-se resistentes ao desenvolvimento da EAE, enquanto que os animais deficientes para P35 (unidade específica para IL-12) apresentaram um *score* clínico até maior que o grupo controle, evidenciando o papel da IL-23 no desenvolvimento de EAE (CUA et al., 2003). Em seguida, foi demonstrado que linfócitos T CD4 de memória produzem IL-17 quando estimulados com IL-23 (AGGARWAL et al., 2003) e que no modelo de EAE, a reestimulação *in vitro* com o antígeno da imunização e IL-23 aumentou a produção de IL-17 por linfócitos T CD4 (LANGRISH et al., 2005). Além disso, a diferenciação desse subtipo de linfócito parecia não depender dos fatores de transcrição das células Th1 e Th2, bem como as citocinas produzidas por essas células (IFN γ e IL-4, respectivamente) são capazes de reduzir a produção de IL-17 (HARRINGTON et al., 2005; PARK et al., 2005). Portanto, IL-23 é importante para a produção de IL-17 por esse novo subtipo de linfócito, sem alterar a diferenciação de células Th1 ou Th2. Esses linfócitos, denominados como Th17, possuem maior expressão de *Il23r* do que células Th1, os quais, por sua vez, expressam mais *Il12r* que as células Th17 (HARRINGTON et al., 2005). Em seguida, foi demonstrado que TGF- β (MANGAN et al., 2006; VELDHOEN et al., 2006) e IL-6 (BETTELLI et al., 2006; VELDHOEN et al., 2006) eram necessários para diferenciação para o perfil Th17, o que ocorria na ausência de IL-23, que apresenta um papel crítico na estabilidade dessas células (STRITESKY; YEH; KAPLAN, 2008). Além dessas citocinas, também foi demonstrado o papel de IL-1 β e IL-21 na diferenciação dos linfócitos Th17 (BASU et al., 2015; CHUNG et al., 2009; KORN et al., 2007b; WEI et al., 2007), como ilustrado na figura 2.

Posteriormente, foi reportado que os fatores de transcrição ROR γ t e ROR α são críticos na função dos linfócitos Th17, sendo cruciais para a produção de citocinas da assinatura dessas células (IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22). Essas investigações ocorreram através do uso de animais deficientes para *Rorc* ou *Rora* (ROR γ t e ROR α , respectivamente), que apresentaram uma redução proeminente na produção de IL-17 e no desenvolvimento da EAE. Além disso,

foi demonstrado que ambos os fatores de transcrição se ligam na região promotora do gene *Il17a* e que a expressão de *Rorc* e *Rora* é muito maior em linfócitos Th17 do que em Th1, Th2 ou Treg, concluindo-se que ambos são os fatores daquelas células (IVANOV et al., 2006; YANG et al., 2008).

Figura 2. Diferenciação de linfócitos T CD4. Os linfócitos T CD4 *naíve* são ativados através da apresentação de antígeno (**primeiro sinal**), realizada por uma célula apresentadora de antígeno (como uma célula dendrítica) que ocorre via MHC-II, de sinais co-estimulatórios (**segundo sinal**; CD80 e CD86) e da produção de citocinas (**terceiro sinal**). De acordo com as citocinas produzidas, os linfócitos T CD4 *naíve* podem se diferenciar em diferentes subtipos, como Th1, Th2, Th17 ou Treg. Essas células possuem uma assinatura específica com produção de citocinas características de cada subtipo, o que faz com esses subtipos de linfócitos T CD4 modulem diferentes respostas imunes, exercendo diferentes funções. Modificado de (JETTEN, 2009).

Assim, o processo de diferenciação para o padrão Th17 induz a expressão desses fatores de transcrição através do efeito sinérgico de TGF- β e IL-6 (BETTELLI; OUKKA;

KUCHROO, 2007; IVANOV et al., 2006). De forma alternativa, IL-6, IL-1 β e IL-23, na ausência de TGF- β , induzem a diferenciação de células Th17, com assinatura gênica diferente das células que são diferenciadas sob a condição convencional de TGF- β e IL-6. Nesse sentido, foi demonstrado que quando linfócitos T CD4 de animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ são isolados e diferenciados sob as condições de cTh17 (Th17 convencional; TGF- β +IL-6) ou pTh17 (Th17 patogênica; IL-6, IL-1 β e IL-23), e posteriormente transferidas para animais que não expressam linfócitos T ou B (RAG2^{-/-}), as células que foram diferenciadas na condição pTh17 induzem um desenvolvimento maior da EAE (com maior *score* clínico) (CHUNG et al., 2009; GHORESCHI et al., 2010).

Além dos fatores de transcrição ROR γ t e ROR α , outro fator de transcrição crítico na diferenciação de linfócitos Th17 é o STAT3 (*Signal transducers and activators of transcription 3*), cuja fosforilação é induzida por IL-6, IL-21 e IL-23, mas que também necessita de TGF- β para regular positivamente sua expressão (CHEN et al., 2006; QIN et al., 2009). Foi demonstrado que a deficiência de STAT3 em linfócitos T reduz a diferenciação de linfócitos Th17 *in vivo* e *in vitro*, o que é corroborado através da expressão da forma ativa de STAT3 por meio de transdução retroviral, a qual potencializou a diferenciação de linfócitos Th17. Além disso, quando animais deficientes para STAT3 em linfócitos T CD4 são submetidos ao protocolo de EAE eles são completamente resistentes (HARRIS et al., 2007; YANG et al., 2007). Como já abordado, a transdução retroviral da forma ativa de STAT3 aumentou a diferenciação de células Th17. No entanto, quando a transdução é realizada em células deficientes para ROR γ t, há uma redução na diferenciação de linfócitos Th17 *in vitro*, quando comparadas a células que expressam ao mesmo tempo esses dois fatores de transcrição, demonstrando o efeito sinérgico de ROR γ T e STAT3 na produção de IL-17 (ZHOU et al., 2007).

No contexto de autoimunidade, o tratamento com anticorpos neutralizantes ou a deficiência para os fatores de transcrição dos linfócitos Th17, citocinas importantes na sua diferenciação ou produzidas por estas células apresentam atenuação ou completa proteção no desenvolvimento da EAE (CUA et al., 2003; EUGSTER et al., 1998; GIJBELS et al., 1995; HOFSTETTER et al., 2005; IVANOV et al., 2006; KOMIYAMA et al., 2006a; MARTIN; NEAR, 1995; MENDEL et al., 1998; YANG et al., 2008). Além disso, a expressão de IL-17 encontra-se aumentada em células mononucleares do sangue periférico e no líquido cérebro-espinhal de pacientes com EM quando comparado a indivíduos saudáveis. Ainda, quando pacientes em fase de remissão da doença são comparados com aqueles que estão com as manifestações clínicas ativas, estes apresentam maior expressão desta citocina (HAVRDOVÁ et al., 2016).

Os linfócitos T reguladores possuem como fator de transcrição *master* o FoxP3 (Forkhead box P3), o qual é crucial no desenvolvimento e função destas células (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003). A importância desse fator de transcrição é exemplificada pelo fato de que a sua deficiência é responsável pelo desenvolvimento de um quadro de autoimunidade, denominado de “scurfy” em camundongos e IPEX (síndrome ligada ao X, enteropatia, poliendocrinopatia e disregulação imune) em humanos, caracterizada por uma desordem linfoproliferativa fatal (BENNETT et al., 2001; BRUNKOW et al., 2001). As Tregs podem ser derivadas do timo (Tregs naturais-nTreg), derivados periféricamente (pTreg) ou induzidas *in vitro* (iTreg) (ABBAS et al., 2013), sendo esse processo controlado pelo TGF- β (figura 2), o qual é crítico na expressão de Foxp3 (CHEN et al., 2003). Em conjunto com esta citocina, a IL-2 aumenta a diferenciação de Tregs por fosforilação do fator de transcrição STAT5, levando ao aumento da estabilidade destas células (BURCHILL et al., 2007; ZORN et al., 2006).

Como descrito acima, a principal função das Treg é no controle da homeostasia, impedindo o desenvolvimento de quadros de autoimunidade por regular o sistema imune através de diversos mecanismos, como a expressão de moléculas de supressão, com destaque para CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor*), PD-1 (*programmed death-1*) e LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*); produção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10; indução de morte celular por granzima-B; consumo de IL-2, que é utilizada para a proliferação de outros linfócitos T, o que é mediado pela alta expressão de CD25 nas Tregs (cadeia α do receptor da IL-2, que possui alta afinidade pela citocina, diferente das outras cadeias, β e γ); Outro mecanismo pelo qual as Treg promovem supressão é através da produção de adenosina, por meio da alta expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 que hidrolisam o ATP a ADP, AMP e, posteriormente, a adenosina, esta última apresenta ação anti-inflamatória via receptores de adenosina (A2a) (MIYARA; SAKAGUCHI, 2007; SHEVACH, 2009).

Os linfócitos Th17 e Treg compartilham uma relação próxima no seu desenvolvimento que é a importância da sinalização de TGF- β nessas duas células, apesar das células Th17 também se diferenciarem na ausência dessa citocina. O controle existente entre essas duas células foi evidenciado durante o modelo animal de EAE em que animais deficientes para a cadeia β do receptor da IL-6 (Gp130), que carecem de sinalização de IL-6, apresentaram maior número de células Treg no baço após a imunização com MOG₃₅₋₅₅ do que o grupo controle (KORN et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que há interação entre FoxP3 e ROR γ t, sugerindo que, durante a diferenciação destas células, pode ocorrer um balanço nesse processo dependendo das condições utilizadas, como concentração de TGF- β ou a presença de IL-6 (ZHOU et al., 2008). Nesse sentido, a interação entre esses dois fatores de transcrição ocorre na região do exon 2 de FoxP3, suprimindo a ligação de ROR γ t na região promotora de *Il17a* (ICHIYAMA et al., 2008).

De forma interessante, pacientes com EM ou animais submetidos ao modelo de EAE possuem redução da capacidade supressora dessas células, em relação ao grupo controle (KORN et al., 2007a; VIGLIETTA et al., 2004a). Corroborando a importância das células Treg no controle da resposta imune, a transferência dessas células reduz o desenvolvimento da EAE (KOHM et al., 2002a).

Assim, na EM há aumento da resposta Th17, em detrimento da função reguladora das Tregs, levando a um processo inflamatório devido a desregulação do sistema imune. Nesse contexto, o controle da diferenciação e/ou função de linfócitos Tregs e Th17 é crítico na modulação da resposta imune, sendo um alvo interessante no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças autoimunes (COSTANTINO; BAECHER-ALLAN; HAFLE, 2008; KORN et al., 2009).

1.3 ERK5

As MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógeno) são proteínas intracelulares altamente conservadas que modulam diversas funções celulares, tais como proliferação, apoptose, migração e diferenciação. Esses processos são regulados através da sua função quinase, ao fosforilar resíduos de serina e treonina nos seus substratos, o que culmina em ativação ou inativação. As principais MAPK são ERK1/2, p38, JNK e ERK5 (WADA; PENNINGER, 2004; WEI; LIU, 2002).

ERK5 (quinase regulada por sinal extracelular 5) foi o último dentre os principais membros das MAPK a ser descoberto, tendo sido inicialmente denominado de BMK1 (*Big MAPK 1*), devido ao seu alto peso molecular em relação aos outros membros dessa família, o que ocorre devido ao tamanho da região C-terminal em relação às outras MAPK (LEE, JIING-DWAN, ULEVITCH, R.J., HAN, 1995; ZHOU; BAO; DIXON, 1995). ERK5 é expressa em diferentes tecidos de forma constitutiva, como coração, cérebro, placenta, pulmão, músculo esquelético, rim, pâncreas e etc (LEE, JIING-DWAN, ULEVITCH, R.J., HAN, 1995). Como

dito anteriormente, ERK5 diferencia-se das outras MAPK por alguns fatores, como o seu alto peso molecular, mas também compartilha diversas similaridades.

A região N-terminal de ERK5 (com 406 aminoácidos; a.a.) possui o domínio quinase com alta similaridade com ERK1/2 (ZHOU; BAO; DIXON, 1995). Além disso, ERK5 também possui o CD (do inglês *common docking*), que é a região que permite associações com seus substratos que devem expressar um domínio *docking* (TANOUE et al., 2000). Em relação as diferenças apresentadas por ERK5 em relação as outras MAPK, sobressai-se uma extensa região C-terminal composta por 410 a.a., na qual se destacam o sinal de localização nuclear (NLS, do inglês *nuclear localisation signal*), dois domínios ricos em prolina (PR1: a.a. 434-465 e PR2: a.a. 578-701), uma região de interação com MEF2 (a.a. 440-501) e um domínio de ativação transcricional, o qual é único em relação aos outros membros da família das MAPK (KASLER et al., 2000; MORIMOTO et al., 2007; NITHIANANDARAJAH-JONES et al., 2012), como ilustrado na figura 3.

Figura 3. A Estrutura de ERK5. A molécula de ERK5 é composta por diferentes estruturas importantes na sua função, representadas nas regiões N e C-terminal, com seus respectivos elementos. (NITHIANANDARAJAH-JONES et al., 2012).

Assim como as outras MAPK, ERK5 é capaz de translocar-se para núcleo após sua ativação, a qual é controlada por diversos fatores de crescimento. A MAPKK (MAP quinase quinase) MEK5 medeia esse processo através da fosforilação nos resíduos T218 e Y220 de ERK5, o que foi confirmado pela mutação dos resíduos de treonina e tirosina por alanina e fenilalanina, respectivamente. No entanto, células com mutação no domínio quinase não apresentaram prejuízo na translocação nuclear, demonstrando que a função quinase de ERK5 não é importante para sua localização nuclear (KONDOH et al., 2006). Outra região da estrutura de ERK5 crítica na translocação para o núcleo está entre os a.a. 505-539, denominada de NLS, cuja deleção prejudica a translocação nuclear (YAN et al., 2001). Como esperado, a capacidade ERK5 aumentar a capacidade transcricional de alguns fatores de transcrição, como AP-1, é reduzida quando ocorre prejuízo na sua capacidade de migração nuclear. Além do NLS, que regula a translocação de ERK5 para o núcleo, essa MAPK expressa o sinal de exportação nuclear (NES, do inglês *nuclear export signal*), que determina a localização citoplasmática de ERK5. Foi demonstrado que a função do NES depende da região N e C-terminal e da interação intermolecular dessas, como ilustrado na figura 4 (KONDOH et al., 2006). É importante destacar que em algumas células, mesmo sem estímulo exógeno, ERK5 encontra-se no núcleo, como em linhagens HeLa (célula epitelial) e Rat-1 (fibroblasto). No entanto, isso deve ocorrer devido ao auto grau de ativação dessas células (RAVIV; KALIE; SEGER, 2004).

Figura 4. Ativação e translocação nuclear de ERK5. Em homeostase, ERK5 encontra-se no citoplasma da célula com interação das regiões N e C-terminal formando o NES (sinal de exportação nuclear). Após ser ativado por MEK5, com fosforilação nos resíduos Thr²¹⁸ e Y²²⁰, a conformação de ERK5 é alterada, facilitando a atividade do NLS, a qual estava inibida pelo NES. De forma curiosa, há relatos que ERK5 é capaz de se autofosforilar (nos resíduos: S⁴²¹, S⁴³³, S⁴⁸⁶, S⁴⁹⁶, S⁷²³, S⁷³¹, S⁷³³, S⁷⁶⁰, S⁷⁶⁴, S⁷⁶⁶), mas também no resíduo Thr⁷²³, não demonstrado na figura, aumentando sua atividade transcricional e a atividade do NLS (MODY et al., 2003; MORIMOTO et al., 2007). Após essa autofosforilação, ERK5 translocaria para o núcleo. Modificado de (NITHIANANDARAJAH-JONES et al., 2012).

As MAPK são ativadas por moléculas conhecidas como MAPKK, que por sua vez são reguladas positivamente por MAPKKK. Como dito anteriormente, na via de sinalização de

ERK5, a MAPKK que controla a sua ativação é denominada de MEK5 (ZHOU; BAO; DIXON, 1995) enquanto que as MAPKKK são as MEKK2/3 (NAKAMURA; JOHNSON, 2003). Diversos trabalhos tem demonstrado a importância de MEK5 na ativação de ERK5, de modo que a transfecção de ERK5 só aumenta a atividade transcricional de uma determinada molécula (MEF2, por exemplo), se a célula também for transfectada com MEK5, demonstrando a necessidade dessa molécula para a função de ERK5, por meio da sua fosforilação (KASLER et al., 2000; KATO et al., 2000). Após essa ativação mediada por MEK5, ERK5 é capaz de se autofosforilar em diferentes resíduos como descrito acima, aumentando a sua capacidade transcricional. Os estudos que investigaram essa capacidade de se autofosforilar foram realizados através de mutações em resíduos específicos ou através de cromatografia, não existindo anticorpos comerciais para essa verificação por *western blot*, o que dificulta a investigação da autofosforilação de ERK5 em diferentes contextos (MODY et al., 2003; MORIMOTO et al., 2007).

O processo de ativação de ERK5 é mediado por diferentes fatores de crescimento, hiperosmolaridade e estresse oxidativo (KATO et al., 1997). Os principais fatores de crescimento que induzem fosforilação de ERK5 são: **EGF** (fator de crescimento epidermal, do inglês *epidermal growth factor*) (ESPARIS-OGANDO et al., 2002; KAMAKURA; MORIGUCHI; NISHIDA, 1999; KATO et al., 1998), **BDNF** (fator neurotrófico derivado de cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) (LIU et al., 2003; WANG; SU; XIA, 2006), **NGF** (fator de crescimento do nervo, do inglês *nerve growth factor*) (KAMAKURA; MORIGUCHI; NISHIDA, 1999), **FGF** (fator de crescimento de fibroblastos, do inglês *fibroblast growth factor*) (KESAVAN et al., 2004), **VEGF** (fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*) (ROBERTS et al., 2010) e **PDGF** (fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês *platelet-derived growth factor*) (ROVIDA et al., 2008; TSIOUMPEKOU et al., 2016). Além desses fatores de crescimento, foi demonstrado

que TGF- β (fator de crescimento transformador β , do inglês *transforming growth factor β*) também induz a ativação de ERK5, o que ocorre em diversos tipos celulares, como hepatócitos (MARCHETTI et al., 2008), células epiteliais (BROWNE et al., 2008), podócitos (BADSHAH; BAINES; DOCKRELL, 2014) e fibroblastos (KIM; LIM; WOO, 2013).

Tem sido demonstrado a função de ERK5 em diferentes tipos de células, sendo alguns similares as outras MAPK. Em neurônios, a inibição de ERK5 induz apoptose, enquanto que sua ativação aumenta a memória a longo prazo e a sobrevivência celular (WANG et al., 2014). De forma interessante, a expressão dessa MAPK apresenta gradual redução no cérebro ou em neurônios corticais da fase embrionária até a vida adulta (LIU et al., 2003). Em alguns tipos celulares, o efeito predito de ERK5 na proliferação celular foi evidenciado através do uso de inibidores farmacológicos ou por meio de técnicas de silenciamento, reduzindo a proliferação celular em células epiteliais ou tumorais (GARAUDE et al., 2006; KATO et al., 1998; TUMORIGENESIS et al., 2009; YANG et al., 2010). É importante destacar que animais deficientes para ERK5 apresentam letalidade embrionária, o que é associado a defeitos no desenvolvimento cardíaco e vascular, sugerindo uma função crítica de ERK5 em células cardíacas ou no endotélio (REGAN et al., 2002; SOHN et al., 2002), o que também ocorre em animais deficientes para MEK5 ou MEKK3 (WANG et al., 2005; YANG et al., 2000). Assim, o uso de animais deficientes condicionais através do sistema Cre-Lox permitiu investigar em qual tipo celular ERK5 desenvolve uma função crítica para o desenvolvimento embrionário. Quando foram utilizados animais deficientes para ERK5 em cardiomiócitos não foram observadas alterações cardíacas e os animais sobreviveram por mais de 1 ano, demonstrando que a causa da morte embrionária dos animais deficientes para ERK5 em todas as células não era um defeito direto nos cardiomiócitos. Desta forma, quando foram utilizados animais deficientes para ERK5 em células endoteliais, o fenótipo encontrado foi similar aos animais deficientes em todas as células para ERK5, ilustrando que a morte embrionária dos animais

ERK5^{-/-} ocorre por um defeito nas células endoteliais, levando a hemorragias, uma vez que ERK5 parece ser importante na integridade vascular (HAYASHI et al., 2004).

ERK5 é capaz de modular vários fatores de transcrição, o que ocorre por sua atividade quinase ou por interação proteína-proteína. Dentre os fatores de transcrição que são ativados através da atividade quinase de ERK5 encontram-se MEF2C (KATO et al., 1997) e MEF2D (KATO et al., 2000; YANG et al., 1998), que são membros da família MEF2 (do inglês *myocyte enhancer factor*). De forma interessante, a modulação de ERK5 sobre esses fatores de transcrição é dependente da sua interação com a região C-terminal (BUSCHBECK; ULLRICH, 2005; KASLER et al., 2000). Além dos membros da família MEF, ERK5 também é capaz de aumentar a atividade transcricional de AP-1 e Sap1a (KAMAKURA; MORIGUCHI; NISHIDA, 1999; TERASAWA; OKAZAKI; NISHIDA, 2003). De forma surpreendente, ERK5 também é capaz de regular a atividade transcricional de MEF2 por um mecanismo não dependente da sua atividade quinase, levando ao aumento da ativação das regiões promotoras de Nur77 (conhecido como fator de crescimento do nervo, NGF, do inglês *nerve growth factor*) ou de KLF (do inglês *Krüppel like factor*), o que foi demonstrado através de experimentos com a transfecção de apenas o domínio quinase ou com um constructo sem o domínio quinase de ERK5 em células que expressavam o gene da luciferase sob o domínio das regiões promotoras Nur77 e KLF (KASLER et al., 2000; MORIMOTO et al., 2007; SOHN et al., 2005).

Pouco se sabe a respeito do papel de ERK5 em células do sistema imune. Em macrófagos, a deleção de ERK5 em células mielóides (Lysm⁺) reduz o crescimento tumoral frente ao desafio com linhagens de carcinoma e melanoma, o que foi associado a redução de macrófagos M2 associados ao tumor (TAM) *in vivo* e redução da polarização de macrófagos M2 *in vitro* (GIURISATO et al., 2018; LUIZ, 2015). Os dados a respeito do papel de ERK5 em linfócitos T CD4 determinam que ERK5 não é importante para sobrevivência e proliferação ou no desenvolvimento homeostático dessas células (ANANIEVA et al., 2008). Além disso, sabe-

se que as MAPK são responsáveis pelo controle de diversas funções e vias celulares em diferentes células, como a diferenciação de linfócitos T CD4. Nesse sentido, a inibição farmacológica de JNK e p38 reduz a diferenciação de linfócitos Th17 e de Treg, enquanto que a inibição de ERK1/2 reduz a diferenciação de células Th17 e aumenta a de Treg (CAO et al., 2013; HUBER et al., 2008; LIU et al., 2013; LUO et al., 2015; NOUBADE et al., 2011; TAN; LAM, 2010). No entanto, não há dados acerca do papel de ERK5 na diferenciação e função de linfócitos T CD4 ou no desenvolvimento de doenças autoimunes.

Considerando que ERK5 é ativada por diversos fatores de crescimento, como o TGF- β , em diversos tipos celulares, e que esta citocina é importante para a diferenciação de linfócitos Th17 e Treg (CHEN et al., 2003; IVANOV et al., 2006; MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006), os quais possuem um papel crítico na fisiopatologia de doenças autoimunes, a hipótese deste trabalho é que o TGF- β medeia a ativação de ERK5 em linfócitos, modulando assim a diferenciação destas células Treg e Th17 e, conseqüentemente, atuando na regulação do desenvolvimento de doenças autoimunes, como a EM.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel de ERK5 na diferenciação de linfócitos T reguladores (Tregs) e Th17 e no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE);

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a expressão e fosforilação de ERK5 em linfócitos Treg e Th17;

Racional: Foi demonstrado que TGF- β é capaz de induzir a fosforilação de ERK5 em diferentes tipos celulares, como podócitos, fibroblastos, células epiteliais e hepatócitos (BADSHAH; BAINES; DOCKRELL, 2014; BROWNE et al., 2008; KIM; LIM; WOO, 2013; MARCHETTI et al., 2008), e como ele é utilizado na diferenciação de linfócitos Treg e Th17 (CHEN et al., 2003; MANGAN et al., 2006; VELDHONEN et al., 2006), foi investigado se ERK5 estaria fosforilada nessas células. **Experimental:** Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* provenientes de animais C57BL/6 foram isolados e cultivados por 24, 48 e 72 horas sob condições polarizantes para Treg (TGF- β), Th17 (TGF- β +IL-6) ou uma condição controle chamada de Th0 (sem citocinas). Posteriormente foram coletadas para análise da expressão e fosforilação de ERK5 por *western blot*.

2.2.2 Avaliar o papel de ERK5 na diferenciação de células Treg e Th17;

Racional: Como TGF- β induz a fosforilação de ERK5 em outras células, induzindo sua ativação, talvez em linfócitos T CD4, a ativação de ERK5 poderia modular a sua diferenciação. **Experimental:** Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* provenientes de animais C57BL/6 (*wild type*-

WT), ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} foram isolados e cultivados por 96 horas sob condições polarizantes para Treg (TGF- β) ou Th17 (TGF- β +IL-6), na presença ou ausência de um inibidor de ERK5. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos (α CD4, α FoxP3 ou α IL-17) e analisadas por citometria de fluxo. Para avaliar outras características das células Th17, foi também avaliada a produção de IL-17A e IL-17F ao mesmo tempo, bem como a expressão de IL-23R, outro marcador característico destas células.

2.2.3 Investigar o impacto da deficiência de ERK5 no desenvolvimento homeostático de linfócitos T CD4;

Racional: ERK5 controla diversas funções celulares como proliferação e apoptose. Além disso, a deficiência de ERK5 em células endoteliais é letal durante a fase embrionária (REGAN et al., 2002; SOHN et al., 2002). Assim, foi investigado se ERK5 era vital para o desenvolvimento de linfócitos T.

Experimental: Animais deficientes para ERK5 em linfócitos T foram gerados por meio do sistema Cre-Lox. O timo, os linfonodos (inguinais, braquiais, mesentéricos, axiliares e cervicais) e o baço dos animais foram coletados para avaliar o número e a frequência de linfócitos T CD4 e CD8, bem como a população de células ativadas, memória, linfócitos Treg e Th17 por citometria de fluxo.

2.2.4 Investigar o papel de ERK5 em linfócitos T CD4 para o desenvolvimento da EAE;

Racional: O desenvolvimento do modelo de EAE é orquestrado principalmente por linfócitos Treg e Th17, os quais modulam a participação de outras células (KORN et al., 2009; NOACK; MIOSSEC, 2014). Assim,

o modelo de EAE é uma excelente opção para ver o papel *in vivo* de ERK5 em linfócitos T CD4. **Experimental:** Animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em emulsão contendo CFA (Adjuvante completo de Freund) e tratado com toxina pertussis nos dias 0 e 2 após a imunização. O desenvolvimento da EAE foi avaliado diariamente seguindo o *score* de 0 a 5, variando a cada 0,5. A medula espinhal (região lombar) dos animais foi retirada e avaliada a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento do modelo por qPCR e a expressão de IBA1 e pSTAT3 por *western blot*. Ainda, os linfonodos drenantes da imunização (inguinais) foram removidos para avaliar a frequência de células Th17 e Treg *in vivo*.

2.2.5 Avaliar o papel de TGF- β nos efeitos mediados por ERK5;

Racional: Como discutido anteriormente, TGF- β é capaz de ativar ERK5 em diferentes tipos celulares. Assim, para investigar a sua participação nos efeitos de ERK5, foram realizados experimentos na ausência de TGF- β .

Experimental: Linfócitos T CD4 *naïve* foram isolados de animais C57BL/6, ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} e diferenciados para o perfil Th17 na ausência de Th17 (IL-6, IL-23 e IL-1 β) (CHUNG et al., 2009; GHORESCHI et al., 2010), com ou sem inibidores de ERK5. Após 96 horas de cultura, a diferenciação foi avaliada por meio da frequência de células CD4⁺IL-17⁺ por citometria de fluxo. Além disso, a fosforilação de ERK5 nessas células foi avaliada por meio de *western blot*.

2.2.6 Avaliar o papel de TGF- β na localização de ERK5 em linfócitos Treg e Th17;

Racional: Após a sua ativação, ERK5 é capaz de translocar para o núcleo, aumentando a atividade de alguns fatores de transcrição, como MEF2 e AP-1 (KONDOH et al., 2006; YAN et al., 2001). **Experimental:** Linfócitos T CD4 *naïve* foram isolados de animais C57BL/6 e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β), cTh17 (TGF- β +IL-6), Th0 (sem citocinas) e pTh17 (IL-6+IL-23+IL-1 β) durante 96 horas na presença ou ausência de um inibidor de ERK5. Posteriormente, as células foram coletadas, realizado o fracionamento nuclear e o *western blot* para investigar se ERK5 encontrase no núcleo dessas células, bem como se sua inibição modula o processo de translocação nuclear.

3. Material e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados animais selvagens (*wild type*-WT) da linhagem C57BL/6 com 6-10 semanas de idade, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (USP-RP). Para gerar os animais deficientes para ERK5 em linfócitos T, foi utilizado o sistema Cre-LoxP, que possibilita a deleção de um gene que está flanqueado por regiões LoxP (flox), por meio do cruzamento de animais que expressem a recombinase Cre. Assim, animais ERK5^{flox/flox} foram cruzados com animais que expressavam a recombinase Cre em linfócitos T (CD4^{cre}), gerando após uma série de cruzamentos animais ERK5^{f/f}CD4^{cre}, os quais não expressam ERK5 em linfócitos T. Os animais CD4^{cre} foram obtidas da Jax mice (CD4-Cre; 1Cwi/Bfluj), enquanto que os animais ERK5^{f/f} foram gentilmente cedidos pela Dra. Cathy Tournier, da Universidade de Manchester, Inglaterra ao Dr. Bernhard Ryffel, do CNRS (Le Centre National de la Recherche Scientifique), França, onde foram realizados todos os experimentos com os animais deficientes para ERK5. Além desses, também foram utilizados animais IL-23RGFP ou IL-17AGFP-IL-17RFP provenientes da Universidade de Mainz, Alemanha. Os animais para experimentação no Brasil foram acondicionados no biotério do Departamento de Farmacologia, com temperatura de 23-25 °C, ciclo claro-escuro de 12 horas e com acesso livre a comida e água. Os protocolos desenvolvidos nesse projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, USP, sob protocolo nº 69/2017.

3.2 Cultura de linfócitos T CD4

Linfócitos T CD4 *naïve* (CD4⁺CD25⁻CD44^{low}) foram isolados de linfonodos (inguinais, axilares, braquiais, cervicais e mesentérico) e baço de animais *naïve* com 6 semanas de idade. Após a coleta dos órgãos linfoides (linfonodos e baço), eles foram processados por meio de

uma *cell strainer* (100 μ m) em RPMI 1640 incompleto (RPMI-I; Corning) e as hemácias sofreram lise celular por meio de um tampão de lise para hemácias (ACK; *ammonium-Chloride-potassium*). As células obtidas foram centrifugadas (450 x g, 5 minutos, 4 °C), ressuspensas em RPMI 1640 completo (RPMI-C; suplementado com 200 mM de glutamina, 10.000 unidades de penicilina-streptomicina, 0,2 μ g/ml de anfotericina B, 55 μ M de β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich) e 10% de soro bovino fetal (HyClone-GE Healthcare) e incubadas na estufa por 30 minutos para aderências das células capazes de fazê-lo, com o objetivo de reduzir células que não são linfócitos T CD4 na amostra. Posteriormente, as células foram incubadas com o kit para isolamento de linfócitos T CD4 *naïve* (Miltenyi Biotec), seguindo as recomendações do fabricante, com separação através de colunas magnéticas. Foi obtida uma pureza de mais de 90% de células CD4⁺CD62L^{high} *naïve* em todos os experimentos. Durante a cultura, os linfócitos T CD4 *naïve* foram estimuladas com α CD3 e α CD28, para proliferação celular, e citocinas de acordo com o subtipo de célula desejado, como segue: Th1 (IL-12: 20 ng/ml; 2 μ g/ml de α CD3/ α CD28 revestidos na placa - *coated*), Th2 (IL-4: 20 ng/ml; 2 μ g/ml de α CD3/ α CD28 revestidos na placa - *coated*), Th17 (TGF- β 1+IL6, TGF- β 1+IL-6+IL-23, TGF- β 1+IL-6+IL-23+IL-1 β , IL-6+IL-23+IL-1 β ou TGF- β 3+IL6; TGF- β 1: 2,5 ng/ml; TGF- β 3: 10 ng/ml; IL-6, IL-23 ou IL-1 β : 20 ng/ml; 4 μ g/ml de α CD3 revestido na placa - *coated* e 2 μ g/ml de α CD28 solúvel) e Treg (TGF- β 1: 1 ng/ml; 2 μ g/ml de α CD3/ α CD28 revestidos na placa - *coated*) em uma incubadora a 37 °C, 5% de CO₂ e 8% de umidade por diferentes tempos, quando indicado, ou tendo sido escolhido o tempo de 96 horas para os outros experimentos. Para as culturas de Th1, Th2 e Treg foi utilizado o meio RPMI 1640 (Corning), enquanto que para as de Th17 foi utilizado o IMDM (Corning) (VELDHOEN et al., 2009).

3.3 Ferramentas farmacológicas

Foram utilizados inibidores da via MEK5-ERK5 para avaliar o papel dessa via de sinalização na diferenciação de linfócitos T CD4. O inibidor de MEK5 utilizado foi BIX 02189 (0,3, 1 e 3 μ M). Os inibidores de ERK5 utilizados foram: XMD 8-92 (0,3, 1 e 3 μ M), ERK5-IN-1 (0,1, 0,3 e 1 μ M) e AX 15836 (0,1, 0,3 e 1 μ M), que foram utilizados por 96 horas na cultura. Assim, os inibidores de MEK5/ERK5 foram utilizados desde o momento inicial. Todos os inibidores foram obtidos da Tocris e reconstituídos em 100% de DMSO, com concentrações finais entre 40 mM e 100 mM. Assim, a maior concentração final de DMSO utilizada na cultura foi de 0,0075%.

3.4 Marcação extracelular e intracelular para citometria de fluxo

Após as 96 horas de cultura ou da coleta dos experimentos de EAE, as células foram estimuladas com phorbol 12-myristato-13-acetato (PMA: 50 ng/ml; Sigma Aldrich), ionomicina (500 ng/ml; Sigma Aldrich) e um inibidor do transporte do complexo de golgi (*golgi stop*: 1,5 μ l/ml; BD Biosciences) por 4 horas na estufa (37 °C, 5% CO₂ e 8% de umidade) em meio de cultura completo. A marcação extracelular foi realizada com um marcador de viabilidade celular (Fixable viability dye; 1:3000; eBioscience) e α CD4 (1:200; BD Biosciences) por 10 minutos a temperatura ambiente. Após isso, as células foram centrifugadas e fixadas utilizando o fixador do kit (*transcription factor staining buffer set*; eBioscience) por 15 minutos a temperatura ambiente, com posterior centrifugação. O próximo passo foi a marcação intracelular com α IL-17 (1:200; BD Biosciences) ou α FoxP3 (1:200; eBioscience) por 15 minutos, a temperatura ambiente, diluídos no permeabilizante do kit (*transcription factor staining buffer set*; eBioscience). Após essa etapa, as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em PBS para aquisição por citometria de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences) e análise no FlowJO X (BD Biosciences). Nos experimentos de caracterização dos animais ERK5^{f/f}CD4^{cre}, também foram utilizados os anticorpos α CD8, α CD44 e α CD62L (1:200; BD Biosciences). Para o ensaio de proliferação celular, após o isolamento, as células T

CD4 *naïve* foram marcadas com *cell proliferation dye* (5 μ M), cuja intensidade de fluorescência é reduzida à medida que as células proliferam, sendo avaliado o decaimento do *Dye* como parâmetro de proliferação. Para os experimentos com animais IL-23RGFP e IL-17AGFP-IL-17FRFP, após a marcação extracelular com α CD4 e a *probe* de viabilidade, as células foram imediatamente adquiridas por citometria de fluxo (FASC Symphony; BD Biosciences), sendo a análise feita no FlowJO X (BD Biosciences).

3.5 Genotipagem

Para confirmar o genótipo dos animais deficientes para ERK5 (ERK5^{f/f}CD4^{cre}) ou dos animais controles (ERK5^{f/f}), um pequeno segmento da cauda dos animais foi coletado e incubadas *overnight* com um tampão de lise (proteínase K a 100 μ g/ml em TRIS-HCl 100 mM, pH:8,8) a 56 °C. Os próximos passos foram adicionar isopropanol para precipitação do DNA, centrifugar (13200 x g, 10 minutos, 4° C), ressuspender as amostras em H₂O água ultrapura, quantificar a quantidade de DNA nas amostras e deixa-las com 20 ng/ μ l de DNA. Para reação de PCR, 1 μ l de cada amostra foi adicionada a um *mix* contendo os *primers* específicos das reações para ERK5^{f/f} ou CD4^{cre} (tabela 1), os nucleotídeos (200 μ M) e a *taq* polimerase (*GoTaq Master mix*; Promega), seguindo as instruções do fabricante. A reação foi realizada em um termociclador (ThermoScientific) como segue: 3 minutos a 95 °C; 35 ciclos de: 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C; 5 minutos a 72 °C. Após a reação de PCR, as amostras foram colocadas em um gel de agarose (2%) para separação dos produtos da PCR de acordo com o peso molecular por eletroforese.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ERK5	CCAGGCCAGATAAGGCTAC	AGAGTGCATGTATTTGAGG
CD4	CCAGGGTCGGAGACA ATAAC	CATGTCCATCAGGTTCTTGC
Controle interno	CTAGGCCACAGAATTGAA AGATCT	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCA TCC

Tabela 1. Sequência dos primers utilizadas para PCR convencional para genotipagem dos animais ERK5^{f/f}CD4^{cre}.

3.6 Indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE)

A EAE foi induzida através da injeção subcutânea em animais com 10 semanas de idade, sob anestesia com isoflurano (2%), do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (Proteimax) em emulsão contendo CFA (Adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich), contendo 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA-Difco)). Nos dias 0 e 2 após a imunização, os animais (ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre}) receberam por via intraperitoneal a administração de toxina pertussis (200 ng/animal). Os sinais clínicos da EAE foram observados diariamente e mensurados através da descrição a seguir: 0: Nenhum sinal clínico; 0,5: Cauda parcialmente flácida; 1: Cauda flácida; 1,5: Apresenta marcha levemente alterada, com dificuldade em se locomover; 2: Marcha claudicante, com perda da coordenação; 2,5: Uma das patas posteriores está sendo arrastada; 3: Paralisia completa dos membros posteriores; 3,5: Realiza movimentos circulares, sendo incapaz de andar em linha reta ou apresenta membros posteriores juntos, de um lado do corpo; 4: Paralisia parcial dos membros anteriores; 4,5: Movimentos mínimos nos membros anteriores; 5: Paralisia completa dos membros anteriores ou moribundo (STROMNES; GOVERMAN, 2006). É importante destacar que durante os experimentos o *score* máximo encontrado foi de 3,5. A medula espinhal foi coletada no pico da doença (após perfusão transcardíaca com PBS), para avaliação de genes relacionados com o desenvolvimento da doença e para investigar a expressão de IBA1 e pSTAT3. Para avaliar a frequência de células Th17 e Treg *in vivo*, os linfonodos inguinais foram coletados 5 dias após a imunização.

3.7 Avaliação da resposta antígeno-específica na EAE

Para avaliar a resposta antígeno-específica no modelo de EAE, os animais foram imunizados como descrito acima e 5 dias após a imunização, os linfonodos drenantes da imunização (inguinais) foram coletados, processados e reestimulados *in vitro* com o antígeno da imunização (MOG₃₅₋₅₅: 20 ng/ml ou TGF- β +IL-6+IL-23+IL-1 β +MOG₃₅₋₅₅) durante 4 dias. Após esse período, as células foram coletadas, estimuladas com PMA, ionomicina e *golgi stop*

e marcadas para viabilidade, CD4, FoxP3 e IL-17 para análise por citometria de fluxo, como descrito acima. Em seguida, o sobrenadante das culturas foi coletado para mensuração dos níveis de IL-17 e GM-CSF por ELISA.

3.8 ELISA

A produção de IL-17, GM-CSF, IL-22, IFN γ e IL-13 foi mensurada no sobrenadante das culturas por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), utilizando *kits DuoSet ELISA Development Systems* (R&D Systems) de acordo com as recomendações do fabricante. Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μ l/poço de anticorpos específicos, como: anti-IL-17, anti-GM-CSF, anti-IL-22, anti-IFN γ e anti-IL-13 em PBS, e incubadas *overnight* nas concentrações descritas pelo fabricante. As placas foram lavadas com PBS/Tween 20 (0,05%-Sigma Aldrich) e PBS, e as ligações não específicas foram bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA (Sigma Aldrich) por 1 hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e a curva padrão e as amostras foram incubadas *overnight* a 4 °C. O próximo passo foi lavar as placas e incubá-las com os anticorpos biotinizados (50 μ l/poço) específicos de cada kit por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com o complexo estreptavidina-peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. O último passo foi a lavagem das placas e adição do substrato para a peroxidase (TMB; KLP). Os dados foram adquiridos em espectrofotômetro (*SpectralMax 190 Microplate reader*; Molecular Devices) e analisados com o programa *SoftMax pro 5*. Os resultados foram expressos em pg/ml.

3.9 PCR em tempo real

Para avaliar a expressão gênica das culturas de linfócitos T CD4 *naïve*, as células foram coletadas em diferentes tempos e o RNA foi extraído usando RNeasy Mini Kit 250 (Quiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram quantificadas em um nanodrop (ThermoFisher) e 500 ng de RNA foram convertidos a cDNA usando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher), de acordo com as instruções do

fabricante. As amostras de medula espinhal foram coletadas em *Trisol reagent* (300 µl/amostra) (Sigma Aldrich) e homogenizadas com a adição de clorofórmio (200 µl; Merck) e água *RNAse free* (100 µl; Sigma Aldrich) e, posteriormente, centrifugadas (13200 x g, 4 °C, 15 minutos). Após a centrifugação, a fase que continha o RNA foi transferida para tubos eppendorf de 1,5mL contendo isopropanol (Merck) a 4 °C e centrifugada em 13200 x g, a 4°C, por 10 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se álcool 75% gelado e foi centrifugado em 13200 x g, a 4°C, por 10 minutos. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se etanol absoluto (Merck, Alemanha) a 4 °C e as amostras foram centrifugadas novamente a 13200 x g, a 4°C, por 10 minutos. Por fim, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se água *RNAse free* e o RNA foi quantificado através do equipamento *nanodrop* (ThermoFisher). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o cDNA, os *primers* e o *master mix Sybr Green* ou *master mix taqman* (ThermoFisher) contendo os produtos da reação, como nucleotídeos e a polimerase. As reações foram realizadas com o aparelho StepOnePlus (ThermoFisher). Os resultados foram analisados através do *cycle threshold* (CT), sendo os dados normalizados pela expressão de *Gapdh* e a diferença entre os grupos calculada através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para determinação do *fold* de aumento ou redução, foi utilizado o grupo de células *fresh* ou animais *naïve* (no experimento de EAE) como calibrador. As sequências dos *primers* utilizados estão descritas a seguir na tabela 2. Nenhum dos *primers* utilizados apresentou amplificação no grupo sem amostra (branco) ou mais de um pico na curva de *melting*. Além disso, todos os *primers* apresentaram eficiência superior a 90%.

<i>Primer</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>
<i>Il17a</i>	GCTCCAGAAGGCCCTCAG	CTTCCCTCCGCATTGACA
<i>Il22</i>	CAGCTCCTGTACATCAGCGGT	AGGTCCAGTTCCCAATCGCCT
<i>Il23r</i>	GCCAAGAAGACCATTCCCGA	TCAGTGCTACAATCTTCTTCAGAGG
<i>Rorc</i>	GAGTTTGCCAAGCGGCTTT	TCCATTGCTCCTGCTTTTCAGT
<i>Foxp3</i>	TTCTCCAGGACAGACCACACT	GTTGCTGTCTTTTCCTGGGTGTA
<i>Gapdh</i>	CATCTTCTTGTGCAGTGCCA	CGGCCAAATCCGTTTAC
<i>Csf2</i>	TTTACTTTTCCTGGGCATTG	TAGCTGGCTGTCATGTTCAA
<i>Il1b</i>	TGACAGTGATGAGAATGACCTG	TTGGAAGCAGCCCTTCATCT
<i>Il6</i>	TTCCTACCCCAATTTCGAAT	CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC
<i>Il21</i>	TCATTGACCTCGTGGCCC	ATCGTACTTCTCCACTTGCAATCC
<i>Il23</i>	CACCTCCCTACTAGGACTCAGC	CTGCCACTGCTGACTAGAAC
<i>Tnfa</i>	TGTGCTCAGAGCTTTCAACAA	CTTGATGGTGGTGCATGAGA
<i>Cxcl1</i>	ACCCGCTCGCTTCTCTGT	AAGGGAGCTTCAGGGTCAAG
<i>Ccl20</i>	GTACTGCTGGCTCACCTCTG	CTTCATCGGCCATCTGTCTTGTG
<i>Itgam</i>	GAGTCTGCCTCCGTGTCCGC	TACGTGAGCGGCCAGGGTCT
<i>Ccr2</i>	ACAGCTCAGGATTAACAGGGAC	ACCACTTGCATGCACACATGAC
<i>Aif1</i>	TGAGGAGCCATGAGCCAAAG	GCTTCAAGTTTGGACGGCAG
<i>Gfap</i>	AGGGCGAAGAAAACCGCATCAC	TCTAAGGGAGAGCTGGCAGGGCT
<i>Cx3cr1</i>	GCCTCTGGTGGAGTCTGCGTG	CGCCCAAATAACAGGCCTCAGCA
<i>Mapk7</i>	Mm00839961_g1	
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizadas para PCR em tempo real

3.10 Western Blot

Para avaliar a expressão proteica de pERK5, ERK5 e Ubiquitinação (Cell signaling), as amostras (linfócitos T CD4) foram coletas em tampão RIPA (Sigma Aldrich) na presença de inibidores de protease e fosfatase (Cell Signaling), centrifugadas (450 x g, 5 minutos, 4° C) e coletado o sobrenadante. Ainda, para avaliar a expressão de IBA1, pSTA3 e STAT3 na medula

espinhal, a mesma foi homogenizada em tampão RIPA com inibidores de protease e fosfatase para posterior centrifugação e coleta do sobrenadante. Em seguida, foi realizada a quantificação de proteínas por *Bicinchoninic acid protein assay* (BCA; Sigma Aldrich). Para os experimentos com amostras de linfócitos T CD4 foram utilizados 5 µg de proteínas, enquanto que para o experimento com amostras da medula espinhal foram utilizados 20 µg. A preparação das amostras foi realizada com Laemmli sample buffer 2x (Bio-rad), e aquecidas por 10 minutos a 95 °C para desnaturação proteica. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida gradiente (4-12%; Bio-rad) e, após a separação, foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 µm (Bio-rad), através do sistema de transferência Trans Blot turbo (Bio-rad). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em TBST (TRIS-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween20 0,05%) com leite 5% (Cell Signaling) para redução de ligações inespecíficas, lavadas com TBST e incubadas com os anticorpos primários diluídos em TBST BSA 5% (Sigma Aldrich), *overnight*, a 4 °C sob agitação lenta. Em seguida, as membranas foram lavadas e adicionou-se os anticorpos secundários (anti-rabbit ou anti-mouse; Sigma Aldrich) em TBST com leite 5% (Cell Signaling), por 2 horas, a temperatura ambiente e agitação lenta. Posteriormente, as membranas foram lavadas por 30 minutos com TBST e adicionou-se o substrato Luminata (Millipore) para a detecção de quimioluminescência, utilizando o equipamento ChemiDocTM XRS (Bio-rad) e analisadas com o programa Image Lab 3.0 (Bio-rad). Foram utilizados β-actina (linfócitos T CD4) e GAPDH (medula espinhal) (Cell Signaling) como controles de carregamento proteico.

3.11 Fracionamento Nuclear

Para avaliar a localização de ERK5 em linfócitos T CD4, as células foram coletadas após 96 horas de cultura e realizada a separação de citoplasma e núcleo utilizando o kit *NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (ThermoFisher), conforme descrito pelo fabricante. Após o fracionamento do citoplasma e núcleo, as amostras foram quantificadas

pelo método de BCA e colocadas em Laemmli sample buffer 2x (Bio-rad), para posterior desnaturação das proteínas, como descrito acima. Os próximos passos foram similares a um *western blot*. A nucleofosmina foi utilizada como controle de carregamento proteico do núcleo e para avaliar uma possível contaminação de fração nuclear no citoplasma. O GAPDH foi utilizado como controle de carregamento proteico do citoplasma e, de forma mais importante, ele serve como controle de contaminação do citoplasma no núcleo.

3.12 Análise estatística

Quando os experimentos compreendiam dois grupos experimentais foi utilizado o teste t de Student. Em experimentos com mais de dois grupos, os dados foram analisados por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. Na EAE, o *score* clínico foi analisado por meio de ANOVA duas-vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos em média $\pm$ E.P.M, sendo analisados com o programa *Graph Pad Prism 8.0*. Foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.

4 Resultados

ERK5 pode ser ativada por diferentes fatores de crescimento em diferentes células. Um desses fatores de crescimento é o TGF- β , o qual desempenha um papel importante na diferenciação de linfócitos Treg e Th17. Assim, inicialmente foi investigado se ERK5 encontrava-se ativada (fosforilada) nessas células. Como poder ser observado na figura 5, há aumento da fosforilação de ERK5 em linfócitos Treg ou Th17 em diferentes tempos de cultura (24, 48 e 72 horas), sugerindo-se que TGF- β poderia induzir sua ativação.

Figura 5. ERK5 encontra-se fosforilada em células Treg e Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β) ou Th17 (TGF- β +IL6) durante 24, 48 ou 72 horas. Foi utilizado um grupo sem citocinas (Th0) como controle. A expressão de pERK5 foi avaliada por *western blot*. A β -actina foi utilizada como controle do carregamento proteico.

O próximo questionamento foi se uma vez ativada em linfócitos Treg e Th17, ERK5 exerceria algum papel na diferenciação dessas células. Para tanto, foram utilizados diferentes inibidores da via de sinalização de ERK5. O primeiro foi um inibidor da atividade catalítica de MEK5 (BIX 02189), a MAPKK que ativa ERK5. Como demonstrado na figura 6, a inibição de MEK5 não altera a diferenciação de células Treg. Para validar o efeito do inibidor, o mesmo foi testado em cultura de macrófagos M2, com redução da polarização dessas células (LUIZ, 2015).

Figura 6. A inibição de MEK5 não altera a diferenciação de células Treg. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β) por 96 horas com ou sem um inibidor de MEK5 (BIX 02189: 0,3, 1 ou 3 μ M). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células FoxP3⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Em seguida, para avaliar o papel de ERK5 na diferenciação de células Treg, foi utilizado como ferramenta farmacológica dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92 e ERK5-IN-1). Como ilustrado na figura 7, a inibição de ERK5 reduziu a diferenciação de células Treg, observada pela redução da frequência de células FoxP3⁺. De forma interessante, os dados sugerem que ERK5 modula a diferenciação de células Treg, de forma independente de MEK5.

Figura 7. A inibição de ERK5 reduz a diferenciação de células Treg. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF-β) por 96 horas com ou sem dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 0,3, 1 ou 3 μM ou ERK5-IN-1: 0,1, 0,3 ou 1 μM). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células FoxP3⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Os inibidores de ERK5 são capazes de supostamente inibir sua autofosforilação, que promoveria uma ativação plena de ERK5, aumentando sua função como quinase e a atividade transcricional. No entanto, como descrito anteriormente, a avaliação desse parâmetro não é simples, visto que depende de experimentos de fosfoproteômica, desenvolvimento de anticorpos específicos ou imunoprecipitação de ERK5, seguida da avaliação da fosforilação dos resíduos específicos. Assim, foi avaliada a fosforilação nos resíduos T218 e Y220, com um indicativo da ativação dessa MAPK (Referência). Como pode ser observado na figura 8 e já descrito na figura 5, há maior fosforilação de ERK5 em células Treg do que no grupo controle Th0. Além disso, os dois inibidores de ERK5 reduziram a fosforilação de ERK5 nos resíduos indicados. Curiosamente, foi observada uma diferença acentuada na expressão de ERK5 total

entre o grupo Th0 e o Treg em 96h, o que não foi observado em outros tempos (24, 48 e 72h). Portanto, conclui-se que inibição de ERK5 reduz a diferenciação de linfócitos Treg e a fosforilação de ERK5 nessas células.

Figura 8. A inibição de ERK5 reduz a sua fosforilação em células Treg. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF-β) na presença ou ausência de dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 3 μM; ERK5-IN-1: 1 μM). Foi utilizado um grupo sem citocinas (Th0) como controle. A expressão de pERK5 foi avaliada por *western blot*. A β-actina foi utilizada como controle do carregamento proteico.

Posteriormente, foi avaliado o papel da sinalização MEK5/ERK5 na diferenciação de linfócitos Th17. Inicialmente, foi utilizado o inibidor de MEK5, que não alterou a diferenciação de linfócitos Th17 (figura 9), enquanto que a inibição de ERK5, com os dois inibidores, aumentou a diferenciação dessas células (figura 10), observada por aumento da frequência de células IL-17A⁺.

Figura 9. A inibição de MEK5 não altera a diferenciação de células Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF-β+IL6) por 96 horas com ou sem um inibidor de MEK5 (BIX 02189: 0,3, 1 ou 3 μM). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células IL-17⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Figura 10. A inibição de ERK5 aumenta a diferenciação de células Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF-β+IL-6) por 96 horas com ou sem dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 0,3, 1 ou 3 μM ou ERK5-IN-1: 0,1, 0,3 ou 1 μM). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células IL-17⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Assim como foi realizado com células Treg, também foi avaliada a possível inibição da fosforilação dessa MAPK pelos inibidores de ERK5. Como pode ser observado na figura 11, a inibição de ERK5 reduziu a fosforilação de ERK5. Além disso, da mesma forma que observado na figura 5, a expressão de pERK5 é maior em células Th17 do que no grupo controle Th0, assim como a expressão de ERK5 total.

Figura 11. A inibição de ERK5 reduz a sua fosforilação em células Th17. Linfócitos T $CD4^+CD25^-CD44^{low}$ *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF- β +IL-6) na presença ou ausência de dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 3 μ M; ERK5-IN-1: 1 μ M). Foi utilizado um grupo sem citocinas (Th0) como controle. A expressão de pERK5 foi avaliada por *western blot*. A β -actina foi utilizada como controle do carregamento proteico.

Foi demonstrado que a inibição de ERK5 reduziu a diferenciação de células Th17, sendo utilizado como parâmetro a frequência de células IL-17A⁺. No entanto, esses linfócitos são capazes de produzir outras citocinas, como por exemplo IL-17F, a qual é atribuída uma característica não patogênica, enquanto que a IL-17A é relacionada com um fenótipo mais patogênico. Assim, foi investigado se ERK5 modularia especificamente IL-17A ou também IL-17F. Para tal, foram utilizados animais IL-17A^{GFP}-IL-17F^{RFP}. Como ilustrado na figura 12, a inibição de ERK5 não alterou a frequência de células simples positivas para IL-17F, ou seja, IL-17A⁻IL-17F⁺. No entanto, houve aumento na população duplo positiva (IL-17A⁺IL-17F⁺) e

moderada redução na população simples positiva para IL-17A (IL-17A⁺IL-17F⁻). Vista a associação de IL-17A e IL-17F com patogenicidade e não patogenicidade (WANKE et al., 2018), respectivamente, foi avaliada a produção delas em diferentes condições para diferenciação de células Th17. Desta forma, foram utilizadas as condições: TGF- β +IL-6 (I), TGF- β +IL-6+IL-23+IL-1 β (II) ou IL-6+IL-23+IL-1 β (III), sendo a primeira considerada não patogênica enquanto que as outras são patogênicas (CHUNG et al., 2009; GHORESCHI et al., 2010; LEE et al., 2012). Foi observado que na condição II, houve aumento da população duplo positivo (IL-17A⁺IL17F⁺), enquanto que houve redução da população IL-17A⁺IL17F⁻, similarmente ao que foi observado com os inibidores de ERK5. Em relação a condição III, houve redução de todas as populações (IL-17A⁺IL17F⁺, IL-17A⁻IL17F⁺ e IL-17A⁺IL17F⁻), sendo as células IL-17A⁻IL-17F⁺ a população mais abundante e a IL-17A⁺IL17F⁻, a com e menor frequência. Portanto, conclui-se que não foi possível associar IL-17A com patogenicidade e IL-17F com não patogenicidade, tendo em vista os resultados obtidos com as condições patogênicas ou não patogênica utilizadas.

Figura 12. A inibição de ERK5 aumenta a frequência de células IL-17A⁺IL-17F⁺. **A)** Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais IL-17A⁺GFP-IL-17F⁺RFP *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF-β+IL-6, TGF-β+IL-6+IL-23+IL-1β ou IL-6+IL-23+IL-1β) por 96 horas. **B)** Além disso, foram utilizados dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 3 μM ou ERK5-IN-1: 1 μM) sob a condição de TGF-β+IL-6. A diferenciação foi avaliada pela frequência de células IL-17A⁺ e/ou IL-17F⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

É bem estabelecido na literatura que o receptor de IL-23 (IL-23R) é um marcador de estabilidade e, conseqüentemente, de patogenicidade de linfócitos Th17, sendo sua expressão modulada positivamente pela citocina IL-23 (NURIEVA et al., 2007). Assim, o próximo questionamento foi se ERK5 também modularia a expressão de IL-23R, utilizando animais IL-23R⁺GFP. Como ilustrado na figura 13, a inibição de ERK5 não alterou a expressão de IL-23R, sugerindo que essa MAPK pode não ser importante para estabilidade ou patogenicidade das células Th17. No entanto, são necessários outros ensaios para comprovar o efeito de ERK5 na estabilidade e patogenicidade dos linfócitos Th17. Portanto, conclui-se que a inibição de ERK5

aumenta a diferenciação de linfócitos Th17, com aumento da população IL-17A⁺IL-17F⁺, sem alterar a expressão de IL-23R.

Figura 13. A inibição de ERK5 não altera a expressão de IL-23R. **A)** Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais IL-23RGFP *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF-β+IL-6, TGF-β1+IL-6+IL-23+IL-1β ou TGF-β3+IL-6) por 96 horas. **B)** Além disso, foram utilizados dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 3 μM ou ERK5-IN-1: 1 μM) sob a condição de TGF-β+IL-6. A expressão de IL-23R foi avaliada por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativos quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Nos últimos anos, foi demonstrado que o inibidor de ERK5 XMD 8-92 possui efeitos não específicos a ERK5, sendo que diversos efeitos que foram atribuídos a essa MAPK em virtude do uso desse inibidor, eram decorrentes desse efeito não seletivo. Assim, foi demonstrado que o XMD 8-92 é capaz de inibir a atividade de *Bromodomain*, que são módulos

de proteínas responsáveis pelo reconhecimento de resíduos de lisina acetilados, questionando os experimentos realizados com essa ferramenta farmacológica. Além disso, foi desenvolvido um inibidor de ERK5 para a sua atividade quinase, que carecia de um efeito não específico sobre atividade de *Bromodomain* (LIN et al., 2016). Nesse sentido, esse inibidor específico para atividade quinase de ERK5 foi utilizado na diferenciação de linfócitos Treg e Th17, com objetivo de avaliar se a atividade quinase de ERK5 era importante para a diferenciação dessas células. Como ilustrado nas figuras 14 e 15, a inibição da atividade quinase de ERK5 com AX15836 não alterou a diferenciação de células Treg ou Th17, sugerindo que a atividade quinase de ERK5 pode não ser importante para o seu efeito.

Figura 14. A inibição da atividade quinase de ERK5 não altera a diferenciação de células Treg. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β) por 96 horas com ou sem um inibidor da atividade quinase de ERK5 (AX15836: 0,1, 0,3 ou 1 μ M). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células FoxP3⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Figura 15. A inibição da atividade quinase de ERK5 não altera a diferenciação de células Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF-β+IL6) por 96 horas com ou sem um inibidor da atividade quinase de ERK5 (AX15836: 0,1, 0,3 ou 1 μM). Além disso, também foram utilizados controles positivos da diferenciação dessas células, como TGF-β+IL-6+IL-23 ou TGF-β+IL-6+IL-23+IL-1β. A diferenciação foi avaliada pela frequência de células IL-17⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Com o objetivo de confirmar os dados obtidos com os inibidores de ERK5, foram gerados animais deficientes para ERK5 em linfócitos T. Para tanto, foi utilizado o sistema Cre/LoxP, cruzando animais CD4^{cre} com ERK5^{f/f} (figura 16A). A deficiência de ERK5 em linfócitos T CD4 (ERK5^{f/f}CD4^{cre}) foi identificada por meio de PCR convencional (figura 16B) e confirmada por avaliação da sua expressão proteica (figura 16C). É importante destacar que os animais ERK5^{f/f} foram utilizados como controle de todos os experimentos realizados com os animais deficientes para ERK5 em células T.

Figura 16. Geração de animais deficientes para ERK5 em linfócitos T. Para obtenção de animais deficientes para ERK5 em linfócitos T (ERK5^{f/f}CD4^{cre}), foi realizado o cruzamento entre animais CD4^{cre} e ERK5^{f/f}. Com os filhotes desse casal (F1), foram gerados novos casais (ERK5^{f/wt}CD4^{cre} x ERK5^{f/wt}), gerando a F2 que apresenta animais com diversos genótipos. Em seguida, foram feitos casais com genótipo definitivo (ERK5^{f/f}CD4^{cre} x ERK5^{f/f}). **A)** Desenho esquemático do cruzamento entre animais CD4^{cre} e ERK5^{f/f}. **B,C)** Investigação dos genótipos dos animais por meio de PCR convencional, com representação de ERK5^{f/f} (400 pares de base-pb), ERK5^{wt/wt} (360 pb), ERK5^{f/wt} (360 e 400 pb). A expressão da recombinase Cre é visto com 500 pb e foi utilizado um controle endógeno com 324 pb. **D)** A confirmação da deficiência de ERK5 foi também realizada através da avaliação da expressão proteica de ERK5 em linfócitos T CD4.

Em seguida, foi feita uma análise do desenvolvimento homeostático das células deficientes para ERK5. Como pode ser observado na figura 17, a deficiência de ERK5 não alterou a frequência células CD4 ou CD8 no timo e nos linfonodos dos animais. Além disso, não houve alteração do número total de células (dados suplementares – Anexo I). Também não houve diferença na frequência de células naïve, de memória, Treg ou Th17 (figura 18).

Figura 17. A deficiência de ERK5 não altera o desenvolvimento homeostático de linfócitos T. O timo ou os linfonodos (cervicais, braquiais, axilares e inguinais) foram coletados de animais deficientes para ERK5 em linfócitos T (ERK5^{f/f}CD4^{cre}) ou do grupo controle (ERK5^{f/f}) para avaliar o desenvolvimento das células T. A) Frequência de células CD4⁺ e/ou CD8⁺ no timo. B) Frequência de linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ nos linfonodos avaliada por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por test t de Student.

Figura 18. A deficiência de ERK5 não altera a população de células *naïve*, memória, Treg ou Th17 em condições basais. Os linfonodos (cervicais, braquiais, axilares e inguinais) foram coletados de animais deficientes para ERK5 em linfócitos T ($ERK5^{f/f}CD4^{cre}$) ou do grupo controle ($ERK5^{f/f}$) para avaliar a população de células *naïve*, memória, Treg e Th17. **A)** Frequência de células *naïve* CD4^{low}CD62L^{high} ou de memória CD4^{high}CD62L^{low}. **B)** Frequência de células CD4⁺FoxP3⁺ ou CD4⁺IL-17⁺, avaliada por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por test t de Student.

Como diversos trabalhos têm atribuído que todas as MAPK regulam o processo de proliferação celular, foi avaliada a proliferação em linfócitos T CD4 deficientes para ERK5. Para tanto, as células foram incubadas com um *dye* previamente e avaliada proliferação celular por meio da redução da fluorescência desse *dye*. Como ilustrado na figura 19, a deficiência de ERK5 em linfócitos T CD4 não altera a proliferação destas células.

Figura 19. ERK5 não é importante para a proliferação de linfócitos T CD4. Linfócitos T $CD4^+CD25^-CD44^{low}$ naïve foram isoladas e marcadas com *cell proliferation dye* e cultivadas por 72 horas. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo. O decaimento do *dye* é representado pela população a esquerda do histograma (75% e 72,7% em células $ERK5^{f/f}$ e $ERK5^{f/f}CD4^{cre}$, respectivamente), a qual é similar entre linfócitos deficientes para ERK5 e o grupo controle.

Posteriormente, foi avaliado o papel da deficiência de ERK5 na diferenciação de células Treg. Como pode ser observado na figura 20, a deficiência de ERK5 reduziu a frequência de células $FoxP3^+$, o que também foi observado novamente pelos inibidores de ERK5. De forma interessante, esses inibidores não tiveram nenhum efeito na diferenciação de células Treg quando utilizados em linfócitos deficientes para ERK5, demonstrando um efeito específico na diferenciação destas células. Em seguida, foi feito o mesmo com linfócitos Th17 e como ilustrado na figura 21, a deficiência de ERK5 aumenta a frequência de células $IL-17^+$, assim como os inibidores de ERK5, sem efeito não específico destes na diferenciação.

Figura 20. A deficiência de ERK5 reduz a diferenciação de células Treg. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF-β) por 96 horas com ou sem dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 3 μM ou ERK5-IN-1: 1 μM). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células FoxP3⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Figura 21. A deficiência de ERK5 aumenta a diferenciação de células Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF-β+IL-6) por 96 horas com ou sem dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 3 μM ou ERK5-IN-1: 1 μM). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células IL-17⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Foi demonstrado até aqui que a inibição ou deleção de ERK5 reduz a diferenciação de células Treg e aumenta a de Th17, as quais foram condições experimentais em que foi utilizado TGF-β. Assim, foi avaliada a função de ERK5 na diferenciação de linfócitos Th1 e Th2, os quais não necessitam de TGF-β para a sua diferenciação. Como pode ser observado na figura 22, a deficiência de ERK5 não alterou a diferenciação de células Th1 ou Th2.

Figura 22. A deficiência de ERK5 não altera a diferenciação de células Th1 ou Th2. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais *ERK5^{f/f}* ou *ERK5^{f/f}CD4^{cre}* *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para **A)** Th1 (IL-12+IL-2) ou **B)** Th2 (IL-4+IL-2) por 72 horas. A diferenciação foi avaliada por citometria de fluxo pela frequência de células IFN γ ⁺ ou IL-4⁺ para Th1 e Th2, respectivamente. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados pelo teste t de Student.

Em seguida, o papel de ERK5 na diferenciação de linfócitos Treg e Th17 foi confirmada através da avaliação da expressão de genes relacionados com a diferenciação dessas células (Figuras 23 e 24). Além disso, foi mensurado a produção de citocinas no sobrenadante das culturas de linfócitos Th1, Th2 e Th17 (Figura 25).

Figura 23. A deficiência de ERK5 aumenta a expressão de *Il17a*, *Il22*, *Il23r* e *Rorc*. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{Cre} *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF- β +IL-6) por 24, 48 e 72 horas. Em seguida as células foram coletadas com tampão RLT e β -mercaptoetanol para posterior extração de RNA, conversão a cDNA e realização de qPCR. Os dados foram representados em média $\pm$ E.P.M., n = 3. Células *naïve fresh* foram utilizadas como grupo calibrador. Os dados foram normalizados pela expressão de *Gapdh*. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.

Figura 24. A deficiência de ERK5 reduz a expressão de *Foxp3*. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{Cre} *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β) por 24, 48 e 72 horas. Em seguida as células foram coletadas com tampão RLT e β -mercaptoetanol para posterior extração de RNA, conversão a cDNA e realização de qPCR. Os dados foram

representados em média $\pm$ E.P.M., $n = 3$. Células *naïve fresh* foram utilizadas como grupo calibrador. Os dados foram normalizados pela expressão de *Gapdh*. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.

Figura 25. A deficiência de ERK5 aumenta a produção de IL-17, IL-22 e GM-CSF, mas não altera a de IFN γ e IL-13. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{Cre} *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para **A)** Th1 (IL-12+IL-2), **B)** Th2 (IL-4+IL-2) ou **C)** Th17 (TGF- β +IL-6) por 96 horas. Em seguida, o sobrenadante das culturas foi coletado para mensuração de citocinas por ELISA. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., $n = 3$. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Em virtude dos dados obtidos da função de ERK5 na diferenciação de linfócitos Treg e Th17, e como estas células são críticas na fisiopatologia de doenças autoimunes, foi avaliado o papel de ERK5 no desenvolvimento de um modelo animal de esclerose múltipla (EAE). Assim, o modelo de EAE foi realizado como descrito anteriormente. Pode-se observar na figura 26 que

animais deficientes para ERK5 em linfócitos T CD4 apresentam maior desenvolvimento da EAE, representado pelo *score* clínico do modelo, e uma incidência igual ao grupo controle.

Figura 26. A deficiência de ERK5 em linfócitos T aumenta a gravidade da EAE. A) Animais $ERK5^{f/f}$ ou $ERK5^{f/f}CD4^{cre}$ foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em uma emulsão contendo CFA (5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*) na região dos flancos dos animais. Nos dias 0 e 2 após a imunização, os animais receberam a injeção intraperitoneal de toxina pertussis (200 ng/animal). Em seguida, o *score* clínico da EAE foi avaliado diariamente como descrito na metodologia. B) *Score* clínico dos animais. C) Regressão linear do *score* da EAE. D) Incidência determinada de acordo com a gravidade da EAE. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 9. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida do teste de Tukey.

Baseado nos dados encontrados *in vitro* na diferenciação de células Treg e Th17, foi avaliada a frequência de células Treg e Th17 durante o modelo de EAE em animais $ERK5^{f/f}$ e $ERK5^{f/f}CD4^{cre}$. Assim, 5 dias após a imunização, os linfonodos drenantes da imunização (inguinais) foram retirados, processados e avaliada a frequência de células Treg e Th17 nesses animais. Como pode ser observado na figura 27, a deficiência de ERK5 reduziu a frequência

de células Treg, enquanto aumentou a de linfócitos Th17. Portanto, foi encontrado *in vivo*, no modelo de EAE, dados similares aos dos experimentos *in vitro* com diferenciação de Treg e Th17.

Figura 27. A deficiência de ERK5 em linfócitos T modula diferenciação de linfócitos Treg e Th17 *in vivo* durante a EAE. Animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em uma emulsão contendo CFA (5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*) na região dos flancos dos animais. Nos dias 0 e 2 após a imunização, os animais receberam a injeção intraperitoneal de toxina pertussis (200 ng/animal). Os linfonodos inguinais (drenantes da imunização) foram coletados, processados e estimulados por 4 horas com PMA, ionomicina e *golgi stop*. Em seguida, as células foram marcadas com um marcador de viabilidade celular, α CD4, α IL-17 ou α FoxP3. Posteriormente os dados foram analisados por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 5. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey.

Em seguida, foi avaliada a frequência de células Treg e Th17 frente a uma resposta antígeno-específica. Assim, as células dos linfonodos foram reestimuladas *in vitro* com o peptídeo da imunização (MOG₃₅₋₅₅) ou esse antígeno e citocinas para diferenciação para Th17

(TGF- β +IL-6+IL-23+IL-1 β). Como está ilustrado na figura 28, as células provenientes de animais ERK5^{f/f}CD4^{cre} possuem maior frequências de células IL-17⁺ e menor de FoxP3⁺ em relação ao controle, quando estimuladas apenas com MOG₃₅₋₅₅. Quando as células foram estimuladas com MOG₃₅₋₅₅ e as citocinas citadas, não houve diferença em células FoxP3⁺, mas o grupo ERK5^{f/f}CD4^{cre} apresentou maior frequência de células IL-17⁺ do que o controle. Ainda, quando avaliada a produção de IL-17 e GM-CSF no sobrenadante da cultura, foi observada maior quantidade dessas citocinas no grupo de células deficientes para ERK5 em linfócitos T.

Figura 28. A deficiência de ERK5 em linfócitos T reduz a diferenciação de células Treg e aumenta a de linfócitos Th17 em um ensaio antígeno-específico. Animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em uma emulsão contendo CFA (5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*) na região dos flancos dos animais. Nos dias 0 e 2 após a imunização, os animais receberam a injeção intraperitoneal de toxina pertussis (200 ng/animal). **A,B)** Os linfonodos inguinais (drenantes da imunização) foram coletados, processados e estimulados por 96 horas com o MOG₃₅₋₅₅ ou MOG₃₅₋₅₅+TGF- β +IL-6+IL-23+IL-1 β . Em seguida, as células foram estimuladas com PMA, ionomicina e golgi stop e marcadas com um marcador de viabilidade celular, α CD4, α IL-17 e α FoxP3. Posteriormente, os dados foram analisados por citometria de fluxo. **C)** O sobrenadante dessas culturas foi coletado para avaliar a produção de IL-17 e GM-CSF por ELISA. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 5.

Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey.

Com objetivo de avaliar o processo inflamatório na medula espinhal dos animais, foi coletada a sua porção lombar no pico da doença (dia 15) para investigar a expressão de IBA1, pSTAT3 e a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento da EAE (Figuras 29, 30 e 31, respectivamente). Foi demonstrado que a expressão de IBA1, pSTAT3 ou dos genes avaliados, encontrava-se maior na medula espinhal dos animais $ERK5^{f/f}CD4^{cre}$, sugerindo um maior processo inflamatório no SNC desses animais.

Figura 29. A deficiência de ERK5 em linfócitos T aumenta a expressão de IBA1 durante a EAE. Animais $ERK5^{f/f}$ ou $ERK5^{f/f}CD4^{cre}$ foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em uma emulsão contendo CFA (5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*) na região dos flancos dos animais. Nos dias 0 e 2 após a imunização, os animais receberam a injeção intraperitoneal de toxina pertussis (200 ng/animal). No pico da doença (dia 15) os animais foram perfundidos com PBS e retirada a porção lombar da medula espinhal para avaliar a expressão de IBA1 por *western blot*. GAPDH foi utilizado como controle do carregamento proteico.

Figura 30. A deficiência de ERK5 em linfócitos T aumenta a expressão de pSTAT3 durante a EAE. Animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em uma emulsão contendo CFA (5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*) na região dos flancos dos animais. Nos dias 0 e 2 após a imunização, os animais receberam a injeção intraperitoneal de toxina pertussis (200 ng/animal). No pico da doença (dia 15) os animais foram perfundidos com PBS e retirada a porção lombar da medula espinhal para avaliar a expressão de pSTAT3 por *western blot*. GAPDH foi utilizado como controle do carregamento proteico.

Figura 31. A deficiência de ERK5 em linfócitos T aumenta a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento da EAE. Animais ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em uma emulsão contendo CFA (5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*) na região dos flancos dos animais. Nos dias 0 e 2 após a imunização, os animais receberam a injeção intraperitoneal de toxina pertussis (200 ng/animal). No pico da doença (dia 15) os animais foram perfundidos com PBS e retirada a porção lombar da medula espinhal para posterior extração de RNA, conversão a cDNA e realização da qPCR. Os dados foram representados em média ± E.P.M., n = 4. O grupo *naïve* foi utilizado como grupo calibrador. Os dados foram normalizados pela expressão de *Gapdh* e expressos em *Heat map*.

Desta forma, foi evidenciado que a inibição ou deleção de ERK5 reduz a diferenciação de células Treg e aumenta a de Th17, sem alterar a de Th1 e Th2, células que não necessitam de TGF- β para se diferenciarem. Além disso, foi demonstrado que ERK5 encontra-se fosforilado em linfócitos Treg e Th17. Nesse sentido, foi questionado se os efeitos mediados por ERK5 são dependentes da via de sinalização de TGF- β , bem como confirmar a importância dessa citocina para a fosforilação de ERK5. Para tal, linfócitos T CD4 *naïve* provenientes de animais WT, ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} foram isolados e cultivados sob uma condição polarizante para Th17 sem TGF- β (IL-6+IL-23+IL-1 β). Essa condição é denominada de

patogênica (pTh17), em virtude de sua capacidade de induzir uma EAE mais grave quando células de animais 2D2 (que apresentam TCR específico para MOG₃₅₋₅₅) são diferenciadas para pTh17 e transferidas para animais RAG2^{-/-}, quando comparadas com células 2D2 diferenciadas com a condição convencional TGF- β +IL-6 (cTh17) (GHORESCHI et al., 2010). Além dessa condição de diferenciação para Th17, foi utilizado um grupo controle sem adição de nenhuma citocina (Th0). Como ilustrado na figura 28, a inibição ou deleção de ERK5 não altera a diferenciação de células Th17 na ausência de TGF- β . Portanto, esses dados demonstram que TGF- β medeia os efeitos de ERK5 na diferenciação de células Th17. Como é impossível diferenciar células Treg sem esta citocina, presume-se que o mesmo seja verdadeiro para linfócitos Treg.

Figura 32. TGF- β medeia os efeitos de ERK5 na diferenciação de linfócitos T. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais WT, ERK5^{f/f} ou ERK5^{f/f}CD4^{cre} *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (IL-6+IL-23+IL-1 β) por 96 horas com ou sem dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 3 μ M ou ERK5-IN-1: 1 μ M). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células IL-17⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Para corroborar esse dado da importância de TGF- β na função de ERK5, foi avaliada a fosforilação de ERK5 nas condições cTh17 e pTh17, além do grupo controle Th0. Como ilustrado na figura 33, a fosforilação de ERK5 é drasticamente reduzida na ausência de TGF- β . Como já apresentado anteriormente, o mesmo acontece com a expressão total da proteína.

Figura 33. TGF- β induz a fosforilação de ERK5 em linfócitos T. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais WT *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF- β +IL-6 ou IL-6+IL-23+IL-1 β) por 96 horas. Em seguida, as células foram coletadas para avaliar a expressão de pERK5 por *western blot*. β -actina foi utilizada como controle do carregamento proteico.

Os dados acima demonstram a necessidade da sinalização de TGF- β para a ativação de ERK5 e sua função, sugerindo que em uma condição considerada “patogênica” ERK5 não teria efeito. Assim, foi avaliada a função de ERK5 em uma condição patogênica da diferenciação de linfócitos Th17. Nesse sentido, as células foram cultivadas sob duas condições diferentes: TGF- β 1+IL-6, que é a condição convencional utilizada em todo o trabalho ou TGF- β 3+IL-6, a qual induz linfócitos Th17 com uma assinatura gênica diferente da forma convencional (figura 13A) e capaz de induzir EAE quando células 2D2 são cultivadas sob essa condição e transferidas para indução da EAE passiva. Essa maior capacidade de induzir a EAE é associada ao aumento da expressão de IL-23R pelo TGF- β 3, uma vez que esse receptor confere estabilidade e patogenicidade a linfócitos Th17 (LEE et al., 2012). Como demonstrado na figura 34, a inibição de ERK5 aumentou a diferenciação de células Th17 nas duas condições cultura utilizadas, demonstrando que TGF- β 3 também medeia os efeitos de ERK5. Além disso, assim como TGF- β 1, o TGF- β 3 também induz a fosforilação de ERK5, como ilustrado na figura 35. Portanto, conclui-se que o TGF- β 3 também é capaz de ativar ERK5 e mediar seus efeitos.

Figura 34. ERK5 modula a diferenciação induzida por TGF-β3. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais WT *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF-β1+IL-6 ou TGF-β3+IL-6) por 96 horas com ou sem dois inibidores de ERK5 (XMD 8-92: 3 μM ou ERK5-IN-1: 1 μM). A diferenciação foi avaliada pela frequência de células IL-17⁺ por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média ± E.P.M., n = 3. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Figura 35. TGF-β3 induz a fosforilação de ERK5 em linfócitos Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais WT *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Th17 (TGF-β1+IL-6 ou TGF-β3+IL-6) por 96 horas. Em seguida, as células foram coletadas para avaliar a expressão de pERK5 por *western blot*. β-actina foi utilizada como controle do carregamento proteico.

Sabendo-se da importância da sinalização do receptor de TGF- β na fosforilação de ERK5, foi se questionado se após essa ativação, ERK5 seria capaz de translocar para o núcleo de linfócitos Treg e Th17. Para tal, as células foram fracionadas em núcleo e citoplasma e, em seguida, avaliada a expressão de ERK5 por *western blot*. Como demonstrado na figura 36, ERK5 encontra-se também no núcleo de células Treg e Th17, sugerindo que talvez possua um efeito nuclear na diferenciação dessas células.

Figura 36. ERK5 encontra-se no núcleo de linfócitos Treg e Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais WT *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β) ou Th17 (TGF- β +IL-6) por 96 horas. Em seguida, as células foram coletadas e fracionadas em citoplasma e núcleo. Posteriormente, foi realizado o *western blot* para avaliar se ERK5 era capaz de translocar para o núcleo de linfócitos Treg e Th17. Nucleofosmina foi utilizada com controle do carregamento proteico do núcleo. GAPDH foi utilizado como controle do carregamento proteico do citoplasma e, de forma mais importante, para avaliar uma possível contaminação de citoplasma no núcleo.

Após a constatação de que ERK5 é capaz de translocar para o núcleo de linfócitos Treg e Th17, foi se questionado se o TGF- β seria importante na localização nuclear dessa MAPK. Assim, as células foram cultivadas sob 4 condições diferentes (Th0, pTh17, Treg e cTh17), para avaliar a função de TGF- β na translocação nuclear de ERK5. Como demonstrado na figura 37,

a expressão de ERK5 no núcleo foi maior em condições com TGF- β (cTh17 e Treg), concluindo-se que TGF- β modula a expressão nuclear de ERK5.

Figura 37. TGF- β medeia a localização nuclear de ERK5. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais WT *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β), cTh17 (Th17 convencional; TGF- β +IL-6) ou pTh17 (Th17 patogênica; IL-6+IL-23+IL-1 β) por 96 horas. Foi utilizado um controle experimental sem adição de citocinas (Th0). Em seguida, as células foram coletadas e fracionadas em citoplasma e núcleo. Posteriormente, foi realizado o *western blot* para avaliar a translocação de ERK5 para o núcleo. Nucleofosmina foi utilizada com controle do carregamento proteico do núcleo. GAPDH foi utilizado como controle do carregamento proteico do citoplasma e, de forma mais importante, para avaliar uma possível contaminação de citoplasma no núcleo.

Finalmente, foi avaliada se a inibição de ERK5 por uma ferramenta farmacológica reduz a sua translocação nuclear. Nesse sentido, as células foram cultivadas sob condições polarizantes para Th17 ou Treg na ausência ou presença de um inibidor de ERK5 (XMD 8-92). Como demonstrado na figura 38, a inibição de ERK5 aboliu a translocação nuclear induzido por TGF- β . Portanto, esses dados sugerem que a localização nuclear de ERK5 pode ser importante para o seu efeito na diferenciação de linfócitos Treg e Th17 e, conseqüentemente, no desenvolvimento da EAE.

Figura 38. A inibição de ERK5 reduz a sua translocação para o núcleo. Linfócitos T $CD4^+CD25^-CD44^{low}$ *naïve* foram isolados do baço e linfonodos de animais WT *naïve* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β) ou Th17 (TGF- β +IL-6) por 96 horas na presença ou ausência de XMD 8-92 (3 μ M). Em seguida, as células foram coletadas e fracionadas em citoplasma e núcleo. Posteriormente, foi realizado o *western blot* para avaliar se ERK5 era capaz de translocar para o núcleo de linfócitos Treg e Th17. Nucleofosmina foi utilizada com controle do carregamento proteico do núcleo. GAPDH foi utilizado como controle do carregamento proteico do citoplasma e, de forma mais importante, para avaliar uma possível contaminação de citoplasma no núcleo.

Portanto, o presente estudo demonstrou que ERK5 modula a diferenciação de linfócitos Treg e Th17, por um mecanismo dependente da sinalização de TGF- β , e consequentemente o desenvolvimento da EAE. Desta forma, ERK5 passa a ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças autoimunes, como a EM.

5 Discussão

O conhecimento dos mecanismos que medeiam a diferenciação de linfócitos Th17 e Treg é importante para a compreensão da biologia destas células, bem como permite sugerir novos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças autoimunes, como aEM, a qual apresenta aumento da expressão de *Il17* e redução da função supressora de células Treg (MATUSEVICIUS et al., 1999; VIGLIETTA et al., 2004a). Desta forma, nesse estudo, foi descrita uma nova função para ERK5 como um modulador da diferenciação dessas células, bem como no desenvolvimento da EAE.

Diversos trabalhos têm demonstrado que TGF- β medeia a fosforilação de ERK5 em diferentes tipos celulares (BADSHAH; BAINES; DOCKRELL, 2014; BROWNE et al., 2008; KIM; LIM; WOO, 2013; MARCHETTI et al., 2008), sendo essa citocina importante para a diferenciação de linfócitos Treg e Th17 (CHEN et al., 2003; MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006). No presente trabalho, foi demonstrado que ERK5 encontra-se fosforilado nessas células, o que pode ser decorrente da sinalização de TGF- β . Em seguida, quando avaliada se a via MEK5-ERK5 é importante para a diferenciação de linfócitos Treg e Th17, foi demonstrado que a inibição da atividade catalítica de MEK5 não altera a diferenciação destas células. No entanto, a inibição ou deleção de ERK5 reduziu a diferenciação de linfócitos Treg e aumentou a de Th17, sugerindo que ERK5, mas não MEK5, modula a diferenciação dessas células. De forma curiosa, a ativação de ERK5 é reportada ser mediada por MEK5, sendo esta crítica para a sua função (KASLER et al., 2000; KATO et al., 2000). De fato, TGF- β não consegue ativar ERK5 em hepatócitos que apresentam um mutante negativo para MEK5, que carece de sua atividade, demonstrando a função crítica dessa MAPKK para ativação de ERK5 (MARCHETTI et al., 2008). Contudo, é sugerido neste trabalho, pela primeira vez, um efeito de ERK5 independente de MEK5. É necessário, no entanto, outros estudos para confirmar essa afirmação, como a avaliação da fosforilação de ERK5 em células Treg e Th17 que tiveram a

atividade catalítica de MEK5 inibida ou em células deficientes para MEK5. De forma interessante, a expressão proteica de ERK5 é muito maior em células Treg ou Th17 quando comparadas com condições de cultura sem TGF- β , enquanto que essa diferença não foi observada na expressão gênica de ERK5 (dados suplementares – Anexo I), sugerindo que alguma alteração proteica pós-transducional regularia a expressão de ERK5. Além disso, células Th17 apresentaram maior ubiquitinação do que o grupo controle, e que a inibição de ERK5 reduz a ubiquitinação para níveis similares a uma condição sem TGF- β (dados suplementares – Anexo I). Portanto, a fosforilação de ERK5 poderia evitar a degradação proteossômica de ERK5. No entanto, nossos dados não são suficientes para afirmar isso, sendo necessário uma investigação no processo fosforilação de ERK5-ubiquitinação-degradação proteica.

Diversos efeitos mediados por ERK5 ocorrem devido a sua capacidade de funcionar como proteína quinase (KATO et al., 1997, 2000; YANG et al., 1998), levando a fosforilação e ativação de fatores de transcrição da família MEF2. No entanto, foi sugerido aqui que ERK5 modula a diferenciação de linfócitos Treg e Th17 por um mecanismo não dependente da sua atividade catalítica. De forma interessante, há dados que demonstram que ERK5 pode atuar por meio de interação proteína-proteína, aumentando a atividade transcricional de AP-1, Sap1a, KLF e MEF2 por interação desses fatores de transcrição com a região C-terminal dessa MAPK (KAMAKURA; MORIGUCHI; NISHIDA, 1999; KASLER et al., 2000; MORIMOTO et al., 2007; SOHN et al., 2005; TERASAWA; OKAZAKI; NISHIDA, 2003), o que corrobora nossos dados da ausência de função da atividade quinase de ERK5 na diferenciação de linfócitos Treg e Th17, a qual poderia ocorrer por meio da interação proteína-proteína de ERK5 com moléculas que modulam a diferenciação destas células. No entanto, seria importante confirmar esses dados com o uso de animais que apresentam uma mutação no domínio quinase de ERK5 (domínio

quinase morto), e assim verificar se a atividade quinase dessa MAPK é importante para a diferenciação dessas células.

Os linfócitos Treg e Th17 são críticos na fisiopatologia de doenças autoimunes, como EM. Além disso, as MAPK são associadas com o desenvolvimento do modelo de EAE (AGRAWAL et al., 2006; BRERETON et al., 2009; NAMIKI et al., 2012; NOUBADE et al., 2011). No entanto, não há registros do papel de ERK5 em modelos de autoimunidade. Foi reportado, nesse estudo, que ERK5 funcionaria como um regulador negativo do desenvolvimento da EAE, por um mecanismo associado a diferenciação de linfócitos Treg e Th17, o qual foi observado pela avaliação da frequência dessas células na periferia (linfonodos) e por um ensaio de resposta antígeno-específica. No entanto, não foi verificada a migração dessas células para o SNC, por citometria de fluxo ou análise do infiltrado geral de leucócitos e o processo de desmielinização, que são os melhores parâmetros para caracterização da EAE. Os dados apresentados apenas sugerem maior migração de leucócitos ou ativação de células dos SNC por meio da expressão de genes relacionados com o desenvolvimento da doença e a expressão de moléculas como IBA1 e pSTAT3. Portanto, pela primeira vez, foi reportado a função de ERK5 em um modelo animal de doença autoimune. Infelizmente, não é claro em qual célula ERK5 teria um efeito preponderante para o desenvolvimento da EAE, se seria em Treg ou Th17. Assim, seria necessário investigar se o efeito de ERK5 na EAE é dependente de células FoxP3⁺ ou de IL-17⁺ por meio do uso de animais que possuam a Cre recombinase controlada pela região promotora dessas moléculas, investigando o papel de ERK5 em células já diferenciadas.

Diversos efeitos atribuídos a ERK5 podem ocorrer por efeitos não específicos de algumas ferramentas utilizadas, como o inibidor XMD 8-92 que também inibe a atividade de *Bromodomain* (LIN et al., 2016). Foi demonstrado que pelo menos os efeitos na diferenciação de Treg e Th17 dos inibidores de ERK5 são específicos, por não ser observado nenhum efeito

adicional dessas ferramentas farmacológicas em animais deficientes para ERK5, quando avaliada a frequência de células FoxP3⁺ ou IL-17⁺. A atividade de *Bromodomain* modula a diferenciação de linfócitos Treg e Th17. Em linfócitos Th17, a inibição de *Bromodomain* reduz a diferenciação desse subtipo de linfócito, enquanto que em Treg, o tratamento *in vivo* com dois inibidores produziu diferentes efeitos na expansão de células FoxP3⁺, com redução ou nenhum efeito na população dessas células (COPSEL et al., 2019; MELE et al., 2013). Contudo, seria necessário um estudo que investigasse o efeito direto de *Bromodomain* sobre as células Treg. Portanto, sugere-se que a inibição de ERK5 por XMD 8-92 não altera a diferenciação de linfócitos Treg e Th17 por um mecanismo dependente da atividade de *Bromodomain*.

A função de TGF- β 1 na diferenciação de células Treg e Th17 é muito bem definida, sendo essa citocina crítica para a expressão de FoxP3 e importante para de ROR γ t (CHEN et al., 2003; MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006; YANG et al., 2008). Nesse sentido, os efeitos de ERK5 parecem estar associados a condições que necessitam da sinalização de TGF- β 1, como Treg e Th17, mas não Th1 e Th2, nas quais TGF- β 1 não está presente. Além disso, quando células Th17 (pTh17) foram cultivadas na ausência de TGF- β , em uma condição considerada patogênica (por meio da adição de IL-6, IL-23 e IL-1 β), ERK5 passou a não ser importante para a diferenciação dessas células. Isso seria justificado pela capacidade de TGF- β 1 induzir a ativação de ERK5, sugerindo que a fosforilação de ERK5 seria crítica para os seus efeitos. Assim, os efeitos de ERK5 são observados quando se utilizam TGF- β 1 e IL-6, que é a condição mais utilizada, gerando células Th17 convencionais (cTh17). Esses dois tipos de células Th17 apresentam uma assinatura patogênica diferente, bem como diferem pela capacidade de induzir uma resposta a EAE passiva, sendo atribuído a TGF- β 1 uma característica não patogênica (GHORESCHI et al., 2010). Contudo, essa é uma comparação injusta, visto que há IL-23 em uma dessas condições. IL-23 é responsável pela estabilidade e, consequentemente, patogenicidade das células Th17 (STRITESKY; YEH; KAPLAN, 2008), o

que é confirmado quando células Th17 são diferenciadas na presença de TGF- β 1, IL-6 e IL-23, as quais são capazes de induzir uma resposta encefalotogênica (JÄGER et al., 2009; LEE et al., 2012). Nesse sentido, questionou-se o papel de ERK5 em uma condição patogênica de diferenciação de células Th17, sendo demonstrado que TGF- β 3, o qual aumenta a expressão de IL-23R e promove maior desenvolvimento da EAE que TGF- β 1(LEE et al., 2012), também induz fosforilação de ERK5 e medeia os efeitos dessa MAPK nesta condição patogênica de linfócitos Th17, sugerindo-se que ERK5 não estaria apenas envolvido na diferenciação de células Th17 não patogênicas. No entanto, ERK5 não modula a expressão do receptor de IL-23, mas apenas a diferenciação de linfócitos Th17. A diferenciação de linfócitos Th17 é avaliada pela frequência de células IL-17A⁺, comumente denominadas apenas de IL-17⁺. Outra citocina produzida pelos linfócitos Th17 é IL-17F, a qual é associada com uma característica não patogênica de linfócitos Th17 (WANKE et al., 2018). No entanto, foi reportado que células IL-17A⁺IL-17F⁻ são a menor população de células CD4 que produzem IL-17, enquanto que as populações IL-17A⁺IL-17F⁺ ou IL-17A⁻IL-17F⁺ são as mais frequentes, mesmo em condições tidas como patogênicas. Assim, ERK5 ou IL-23 e IL-1 β modulam a população duplo positiva para IL-17A e IL-17F. Concluindo-se não ser possível atribuir, com esses dados, um perfil não patogênico de IL-17F, mas sim que ERK5 medeia a produção de IL-17A e IL-17F.

Há diversas evidências que após a sua ativação, ERK5 é capaz de translocar para o núcleo, onde aumentaria a atividade transcricional de fatores de transcrição, como os da família MEF2 (YAN et al., 2001), sendo esse processo demonstrado em diversas células de linhagens e/ou por meio da transfecção destas células com a forma ativa de MEK5 (KONDOH et al., 2006). De forma interessante, foi reportado pela primeira vez, em condições fisiológicas, a localização nuclear de ERK5 em uma célula do sistema imune, e que esse processo é mediado por TGF- β e não por MEK5. Além disso, que a inibição de ERK5 reduz a fosforilação dessa MAPK e, conseqüentemente, a sua translocação nuclear. No entanto, como ERK5 é fosforilada

por TGF- β , que proteínas estão envolvidas no processo de translocação nuclear e qual seria a sua função no núcleo permanecem desconhecidas.

Dentre as principais moléculas que são ativadas por ERK5 encontram-se PGC-1 α , KLF, AP-1 e MEF2 (KASLER et al., 2000; KATO et al., 1997, 2000; LIU et al., 2017; MORIMOTO et al., 2007; SOHN et al., 2005). O PGC-1 α foi descoberto como co-ativador de PPAR γ (PUIGSERVER et al., 1998), apesar de ter outras funções celulares. A deficiência dessa molécula em células Treg induz rejeição em transplante cardíaco (BEIER et al., 2015), enquanto que não há trabalhos sobre o papel de PGC-1 α em linfócitos Th17. Corroborando esses dados, nosso laboratório demonstrou que a ativação de PGC-1 α aumentou a diferenciação de células Treg, enquanto que a sua inibição reduziu a diferenciação dessas células. Esses dados sugerem que PGC-1 α seria um potencial alvo para a modulação de ERK5 na diferenciação de células Treg. Contudo, PGC-1 α não modula a diferenciação de linfócitos Th17, sugerindo que ERK5 modularia a diferenciação destas células por outro mecanismo. Outros fatores de transcrição que possuem sua atividade regulada por ERK5 são os membros da família KLF. A deficiência de KLF2 reduz a diferenciação de Treg (PABBISSETTY et al., 2014), enquanto que a deficiência de KLF4 reduz a diferenciação de linfócitos Th17, levando a resistência no desenvolvimento da EAE (LEBSON et al., 2010). Desta forma, KLF2 seria um potencial mecanismo na modulação da diferenciação de células Treg promovida por ERK5, visto que ERK5 ativa KLF2 e a inibição ou deficiência dessa MAPK também reduz a diferenciação de linfócitos Treg. A família de fatores de transcrição AP-1 é regulada por ERK5 através da interação com a cadeia C-terminal dessa MAPK. Dentre os membros dessa família de fatores de transcrição, foi demonstrado que a deleção de JunB induz autoimunidade, visto que ele é um modulador positivo da homeostase de células Treg, por um mecanismo dependente de IRF4, não se sabendo o papel dele para a diferenciação de células Treg (KOIZUMI et al., 2018). Outro membro da família AP-1 é BATF, cuja deficiência leva a redução na diferenciação de células

Th17 e, conseqüentemente, a resistência no desenvolvimento da EAE (SCHRAMML et al., 2009). Desta forma, provavelmente AP-1 não estaria relacionado com a modulação de ERK5 na diferenciação de linfócitos Treg e Th17. Finalmente, os principais fatores de transcrição cuja atividade é regulada por ERK5 são os membros da família MEF2, sendo que não existem dados a respeito desses fatores de transcrição em linfócitos Treg ou Th17, não sendo possível fazer qualquer tipo de associação dos efeitos de ERK5 na diferenciação de células com MEF2. Portanto, dentre os possíveis mecanismos de ação sugeridos, ERK5 poderia modular a diferenciação de células Treg por ativação de PGC-1 α ou KLF2, enquanto que não há indícios de como essa MAPK regularia a diferenciação de células Th17.

Visando a terapêutica, seria necessário o tratamento com um ativador de ERK5, que supostamente promoveria um aumento da diferenciação de células Treg e redução de Th17, levando a uma redução no desenvolvimento da EAE. Infelizmente, não há nenhum composto disponível comercialmente que seja um ativador de ERK5. No entanto, através de *high-throughput screening*, foram avaliados mais 1 mil compostos, sendo identificado estatinas como possíveis ativadores de ERK5 (LE et al., 2014). Quando investigado o efeito de um desses inibidores de HMG-CoA redutase, foi demonstrado que a pitavastatina foi capaz de promover efeitos opostos aos dos inibidores de ERK5, ou seja, redução na diferenciação de células Th17 e aumento de linfócitos Treg, com acentuada redução no desenvolvimento da EAE (manuscrito em anexo). No entanto, foi encontrado que esses efeitos eram independentes de ERK5. Portanto, o desenvolvimento de ativadores de ERK5 poderia ser promissor para investigação em modelos de doenças autoimunes.

6 Conclusão

Em suma, os dados apresentados nesse estudo demonstram que a ERK5 desempenha uma função essencial na sinalização de TGF- β nos linfócitos, sendo necessária para a diferenciação completa em Treg e atuando como um regulador negativo da diferenciação em Th17. De forma mecânica, os efeitos da ERK5 dependem de sua fosforilação e translocação nuclear. Uma representação dos principais achados desse estudo está sumarizada na figura 39.

Figura 39. ERK5 modula a diferenciação de linfócitos Treg e Th17 por um mecanismo dependente da sinalização de TGF- β . A sinalização de TGF- β induz fosforilação de ERK5, ativando-a e alterando seu estado conformacional. Após a sua ativação, ERK5 transloca para o núcleo de linfócitos Treg e Th17, processo que é mediado por TGF- β . Sugere-se que a localização nuclear de ERK5 é importante para o seu efeito em modular a diferenciação de células Treg e Th17, o que ocorre por um mecanismo ainda desconhecido. Figura modificada de (NISHIMOTO; NISHIDA, 2006).

Referências

- ABBAS, A. K. et al. Regulatory T cells : recommendations to simplify the nomenclature. **Nature Immunology**, v. 14, n. 4, p. 307–308, 2013.
- AGABITI, S. S.; LI, J.; WIEMER, A. J. Geranylgeranyl diphosphate synthase inhibition induces apoptosis that is dependent upon GGPP depletion , ERK phosphorylation and caspase activation. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2017.
- AGGARWAL, S. et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1910–1914, 2003.
- AGRAWAL, A. et al. ERK1 $-/-$ Mice Exhibit Th1 Cell Polarization and Increased Susceptibility to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 10, p. 5788–5796, 2006.
- ANANIEVA, O. et al. ERK5 regulation in naïve T-cell activation and survival. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 9, p. 2534–47, 2008.
- BADSHAH, I. I.; BAINES, D. L.; DOCKRELL, M. E. Erk5 is a mediator to TGFB1-induced loss of phenotype and function in human podocytes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 APR, n. April, p. 1–11, 2014.
- BASU, R. et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the Th17 cell–iTreg cell balance. **Nature Immunology**, v. 16, n. 3, p. 286–95, 2015.
- BEIER, U. H. et al. Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3+ T-regulatory cell function and allograft survival. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 6, p. 2315–2326, 2015.
- BENNETT, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 20–21, 2001.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 345–350, 2007.

BRERETON, C. F. et al. Inhibition of ERK MAPK Suppresses IL-23- and IL-1-Driven IL-17 Production and Attenuates Autoimmune Disease. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 1715–1723, 2009.

BROWNE, J. A. et al. TGF-beta activates ERK5 in human renal epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 3, p. 440–4, 2008.

BRUNKOW, M. E. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 68–73, 2001.

BURCHILL, M. A. et al. IL-2 Receptor-Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3+ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 1, p. 280–290, 2007.

BUSCHBECK, M.; ULLRICH, A. The Unique C-terminal Tail of the Mitogen-activated Protein Kinase ERK5 Regulates Its Activation and Nuclear Shuttling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 2659–2667, 2005.

CAO, J. et al. Cyclic AMP suppresses TGF- β -mediated adaptive Tregs differentiation through inhibiting the activation of ERK and JNK. **Cellular Immunology**, v. 285, n. 1–2, p. 42–48, 2013.

CHEN, W. et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-B Induction of Transcription Factor Foxp3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1875–1886, 2003.

CHEN, Z. et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T

cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 21, p. 8137–8142, 2006.

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

COHEN, J. A. et al. Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 5, p. 402–415, 2010.

CONSTANTINESCU, C. S. et al. Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 9, p. 5097–5104, 1998.

CONSTANTINESCU, C. S. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, 2011.

COPSEL, S. N. et al. BET bromodomain inhibitors which permit treg function enable a combinatorial strategy to suppress GVHD in pre-clinical allogeneic HSCT. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, p. 1–13, 2019.

COSTANTINO, C. M.; BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D. A. Multiple sclerosis and regulatory T cells. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, n. 6, p. 697–706, 2008.

CÔTÉ-DAIGNEAULT, J. et al. Potential Immunomodulatory Effects of Statins in Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 3, p. 724–732, 2016.

CRONSTEIN, B. N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The Antiinflammatory Mechanism of Methotrexate. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. December, p. 2675–2682, 1993.

CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 744–748, 2003.

DE ROSBO, N. K. et al. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. **Journal of**

Clinical Investigation, v. 92, n. 6, p. 2602–2608, 1993.

ELLER, P. et al. Atorvastatin attenuates murine anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 77, n. 5, p. 428–435, 2010.

ESPARIS-OGANDO, A. et al. Erk5 Participates in Neuregulin Signal Transduction and Is Constitutively Active in Breast Cancer Cells Overexpressing ErbB2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 1, p. 270–285, 2002.

EUGSTER, H. PIETRO et al. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 7, p. 2178–2187, 1998.

EYLAR, E. H. et al. Experimental allergic encephalomyelitis: Synthesis of disease-inducing site of the basic protein. **Science**, v. 168, n. 3936, p. 1220–1223, 1970.

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

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 330–336, 2003.

FORERO-PENÑA, D. A.; GUTIERREZ, F. R. S. Statins as Modulators of Regulatory T-Cell Biology. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

FOX, R. J. et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 12, p. 1087–1097, 2012.

GARAUDE, J. et al. ERK5 activates NF- κ B in leukemic T cell and is essential for their growth in vivo. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 7609–7617, 2006.

GHORESCHI, K. et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 967–971, 2010.

GIJBELS, K. et al. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6

bioactivity in central nervous system and circulation. **Molecular Medicine**, v. 1, n. 7, p. 795–805, 1995.

GIURISATO, E. et al. Myeloid ERK5 deficiency suppresses tumor growth by blocking protumor macrophage polarization via STAT3 inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 12, p. E2801–E2810, 2018.

GOLD, R. et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 12, p. 1098–1107, 2012.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 393–407, 2009.

HAINES, C. J. et al. Report Autoimmune Memory T Helper 17 Cell Function and Expansion Are Dependent on Interleukin-23. **Cell Reports**, v. 3, n. 5, p. 1378–1388, 2013.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17–producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1123–1132, 2005.

HARRIS, T. J. et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in Th17 development and Th17-dependent autoimmunity. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 4313–4317, 2007.

HART, B. A.; GRAN, B.; WEISSERT, R. EAE: Imperfect but useful models of multiple sclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 3, p. 119–125, 2011.

HAUSER, S. L. et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 7, p. 676–688, 2008.

HAUSER, S. L. et al. Ocrelizumab versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 221–234, 2017.

HAVRDOVÁ, E. et al. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. **Journal of Neurology**, v. 263, n.

7, p. 1287–1295, 2016.

HAYASHI, M. et al. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 8, p. 1138–1148, 2004.

HIRAI, A. et al. Geranylgeranylated Rho Small GTPase (s) Are Essential for the Degradation of p27 Kip1 and Facilitate the Progression from G 1 to S Phase in Growth- stimulated Rat FRTL-5 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 13–16, 1997.

HOFSTETTER, H. H. et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cellular Immunology**, v. 237, n. 2, p. 123–130, 2005.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, p. 1057–1061, 2003.

HUBER, S. et al. P38 MAP kinase signaling is required for the conversion of CD4+CD25- T cells into iTreg. **Plos One**, v. 3, n. 10, p. 1–7, 2008.

ICHIYAMA, K. et al. Foxp3 inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17003–17008, 2008.

IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17 + T Helper Cells. **Cell**, v. 126, p. 1121–1133, 2006.

JACOBS, L. Intrathecal interferon reduces exacerbations of Multiple Sclerosis. **Science**, v. 27, p. 1026–1028, 1981.

JÄGER, A. et al. Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7169–7177, 2009.

JETTEN, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development ,

immunity , circadian rhythm , and cellular metabolism. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 7, p. 1–32, 2009.

JOHNSON, K. P. et al. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. **Neurology**, v. 50, n. 3, p. 701–708, 1998.

KABAT, A.; WOLF, A.; BEZER, A. E. Rapid Production of Acute Disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. **Science**, v. 104, p. 362–363, 1946a.

KABAT, E. A.; WOLF, A.; BEZER, A. E. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. **Journal of Experimental Medicine**, v. 85, p. 1331–1340, 1946b.

KAGAMI, S. et al. Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th 17 cells and Foxp3+ regulatory T cells. **International Immunology**, v. 21, n. 6, p. 679–689, 2009.

KAMAKURA, S.; MORIGUCHI, T.; NISHIDA, E. Activation of the Protein Kinase ERK5 / BMK1 by Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26563–26571, 1999.

KAPPOS, L. et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. **The Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1463–1472, 2008.

KASLER, H. G. et al. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 22, p. 8382–9, 2000.

KATO, Y. et al. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 23, p. 7054–7066, 1997.

KATO, Y. et al. Bmk1/ERK5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth

factor. **Nature**, v. 395, p. 713–716, 1998.

KATO, Y. et al. Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18534–18540, 2000.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1173–1175, 2007.

KESAVAN, K. et al. MEKK2 Regulates the Coordinate Activation of ERK5 and JNK in Response to FGF-2 in Fibroblasts. **Journal of Cellular Physiology**, v. 199, n. 1, p. 140–148, 2004.

KIES, M. W.; MURPHY, J. B.; ALVORD, E. C. Fractionation of guinea pig brain proteins with encephalitogenic activity. **Federation Proceedings**, v. 19, p. 207, 1960.

KIM, S.; LIM, J. H.; WOO, C. H. ERK5 inhibition ameliorates pulmonary fibrosis via regulating Smad3 acetylation. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 6, p. 1758–1768, 2013.

KIM, Y. C.; KIM, K. K.; SHEVACH, E. M. Simvastatin induces Foxp 3 + T regulatory cells by modulation of transforming growth factor- β signal transduction. **Immunology**, v. 130, p. 484–493, 2010.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.; TYLER, K. L. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Complicating Treatment with Natalizumab and Interferon Beta-1a for Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 369–74, 2005.

KNOCHELMANN, H. M. et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 5, p. 458–469, 2018.

KOHM, A. P. et al. Cutting Edge: CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 4712–4716, 2002a.

KOHN, A. P. et al. Cutting Edge: CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 4712–4716, 2002b.

KOIZUMI, S. ICHI et al. JunB regulates homeostasis and suppressive functions of effector regulatory T cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 1, p. 566–573, 2006a.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 566–573, 2006b.

KONDOH, K. et al. Regulation of Nuclear Translocation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 by Active Nuclear Import and Export Mechanisms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 5, p. 1679–1690, 2006.

KORN, T. et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 4, p. 423–431, 2007a.

KORN, T. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 484–487, 2007b.

KORN, T. et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3⁺ regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 47, p. 18460–18465, 2008.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 485–517, 2009.

KUCHROO, V. K. et al. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): Role of Self and Cross-Reactive Antigens in Shaping , Tuning , and Regulating the

- Autopathogenic T Cell Repertoire. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 101–123, 2002.
- LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–240, 2005.
- LE, N. et al. Identification of Activators of ERK5 Transcriptional activity by High-Troughput Screening and the role of Endothelial ERK5 in Vasoprotective Effects Induced by statins and antimalarial agents. **Journal of immunology**, v. 193, n. 7, p. 3803–3815, 2014.
- LEBSON, L. et al. Cutting Edge: The Transcription Factor Kruppel-Like Factor 4 Regulates the Differentiation of Th17 Cells Independently of ROR γ t. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7161–7164, 2010.
- LEE, JIING-DWAN, ULEVITCH, R.J., HAN, J. Primary Structure of BMK1: A new mammalian MAP Kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 213, n. 2, p. 715–724, 1995.
- LEE, J. M.; OLITSKY, P. K. Simple Method for Enhancing Development of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Mice. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 89, n. 2, p. 263–266, 1955.
- LEE, Y. et al. Induction and molecular signature of pathogenic Th17 cells. **Nature Immunology**, v. 13, n. 10, p. 991–999, 2012.
- LEGROUX, L.; ARBOUR, N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes : An Entangled Story. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 10, p. 528–546, 2015.
- LEHMANN, P. V et al. Spreading of Tcell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. **Nature**, v. 358, n. July, p. 155–157, 1992.
- LEONARD, J. P.; WALDBURGER, K. E.; GOLDMAN, S. J. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 1, p. 381–386, 1995.
- LI, D. et al. A Phase II study of the safety and efficacy of teriflunomide in multiple sclerosis

with relapses. **Neurology**, v. 66, p. 894–900, 2006.

LI, X. et al. Atorvastatin ameliorates experimental autoimmune neuritis by decreased Th1 / Th17 cytokines and up-regulated T regulatory cells. **Cellular Immunology**, v. 271, n. 2, p. 455–461, 2011.

LI, X. et al. Molecular and Cellular Neuroscience Atorvastatin-modified dendritic cells in vitro ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated Treg cells and shifted Th1 / Th17 to Th2 cytokines. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 56, p. 85–95, 2013.

LIN, E. C. K. et al. ERK5 kinase activity is not required for cellular immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 42, p. 11865–11870, 2016.

LINDSEY, J. W. EAE: History, clinical signs, and disease course. **Experimental Models of Multiple Sclerosis**, p. 1–9, 2005.

LININGTON, C. et al. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 6, p. 1364–1372, 1993.

LINTHICUM, D. S.; MUNOZ, J. J.; BLASKETT, A. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. **Cellular Immunology**, v. 73, n. 2, p. 299–310, 1982.

LIU, H. et al. ERK differentially regulates Th17- and Treg-cell development and contributes to the pathogenesis of colitis. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 7, p. 1716–1726, 2013.

LIU, L. et al. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 8532–8537, 2003.

LIU, W. et al. Metabolic stress-induced cardiomyopathy is caused by mitochondrial

dysfunction due to attenuated Erk5 signaling. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 494, 2017.

LUBLIN, F. D. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. **Neurology**, v. 96, p. 907–911, 1996.

LUIZ, J. P. M. Estudo da participação da via de sinalização dependente de ERK5 na polarização de macrófagos M2 induzida por IL-4. **Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada), Universidade de São Paulo**, p. 90, 2015.

LÜNEMANN, J. D. et al. Immune reconstitution therapies: concepts for durable remission in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 56–62, 2020.

LUO, X. et al. Cutting Edge: TGF- β -Induced Expression of Foxp3 in T cells Is Mediated through Inactivation of ERK. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 2757–2761, 2015.

MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 2006.

MARCHETTI, A. et al. ERK5/MAPK is activated by TGF β in hepatocytes and required for the GSK-3 β -mediated Snail protein stabilization. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 11, p. 2113–2118, 2008.

MARTIN, D.; NEAR, S. L. Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 61, n. 2, p. 241–245, 1995.

MATUSEVICIUS, D. et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 5, p. 101–104, 1999.

MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 913–919, 2007.

MCGEACHY, M. J. et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17 – producing effector T helper cells in vivo. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3,

p. 314–324, 2009.

MCMAHON, E. J. et al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 335–339, 2005.

MELE, D. A. et al. BET bromodomain inhibition suppresses TH17-mediated pathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 11, p. 2181–2190, 2013.

MELLO, M. M. et al. Shifting Terrain in the Regulation of Off-Label Promotion of Pharmaceuticals. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1557–1566, 2009.

MENDEL, I. et al. Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: A study in gene-targeted mice. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 5, p. 1727–1737, 1998.

MENDEL, I.; DE ROSBO, N. K.; BEN-NUN, A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor V β expression of encephalitogenic T cells. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 7, p. 1951–1959, 1995.

MENG, X. et al. Statins Induce the Accumulation of Regulatory T Cells in Atherosclerotic Plaque. **Molecular Medicine**, v. 18, p. 598–605, 2012.

MILLER, D. H. et al. A Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 1, p. 15–23, 2003.

MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 108–116, 2007.

ML-, N. E. W. B. Y. et al. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, p. 1346–1348, 1976.

MODY, N. et al. An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. **Biochemical Journal**, v. 575, p. 567–575, 2003.

MORGAN, I. M. Allergic Encephalomyelitis in Monkeys in Response To Injection of Normal Monkey Nervous Tissue. **The Journal of experimental medicine**, v. 85, n. 1, p. 131–140, 1947.

MORIKAWA, S. et al. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation and vascular constriction in HUVEC. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 9, p. 178–183, 2002.

MORIMOTO, H. et al. Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35449–35456, 2007.

MORRISON, L. R. Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. **Archives of Neurology And Psychiatry**, v. 58, n. 4, p. 391–416, 1947.

MUNOZ, J. J.; BERNARD, C. C. A.; MACKAY, I. R. Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. **Cellular Immunology**, v. 83, n. 1, p. 92–100, 1984.

MURTHY, S.; TONG, H.; HOHL, R. J. Regulation of Fatty Acid Synthesis by Farnesyl. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 51, p. 41793–41804, 2005.

NAKAMURA, K.; JOHNSON, G. L. PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 36989–36992, 2003.

NAMIKI, K. et al. Mechanism for p38 α -mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 29, p. 24228–24238, 2012.

NISHIMOTO, S.; NISHIDA, E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. **EMBO reports**, v. 7, n. 8, p. 782–786, 2006.

NITHIANANDARAJAH-JONES, G. N. et al. ERK5: Structure, regulation and function. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 11, p. 2187–2196, 2012.

NOACK, M.; MIOSSEC, P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 6, p. 668–677, 2014.

NOUBADE, R. et al. Activation of p38 MAPK in CD4 T cells controls IL-17 production and autoimmune encephalomyelitis. **Blood**, v. 118, n. 12, p. 3290–3300, 2011.

NURIEVA, R. et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 480–483, 2007.

OLITSKY, P. K.; TAL, C. Acute disseminated encephalomyelitis produced in mice by brain protelipide. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 79, p. 50–53, 1952.

OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715–725, 2000.

PABBISSETTY, S. K. et al. KLF2 is a rate-limiting transcription factor that can be targeted to enhance regulatory T-cell production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 26, p. 9579–9584, 2014.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 2005.

PATERSON, P. Y. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 111, n. 18, p. 119–136, 1960.

PATSY, B.M., RAY, W. FDA guidance on off-label promotion and the state of the literature from sponsors. **The Journal of the American Medical Association**, v. 299, n. 16, p. 1949–1951, 2008.

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829–839, 1998.

QIN, H. et al. TGF- β Promotes Th17 Cell Development through Inhibition of SOCS3. **The Journal of Immunology**, n. 23, p. 97–105, 2009.

RAINE, C. S.; PH, D.; SC, D. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 942–955, 2006.

RANSOHOFF, R. M.; HAFLER, D. A.; LUCCHINETTI, C. F. Multiple sclerosis—a quiet revolution. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. March, p. 134–142, 2015.

RAVIV, Z.; KALIE, E.; SEGER, R. MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 9, p. 1773–1784, 2004.

REGAN, C. P. et al. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 14, p. 9248–9253, 2002.

RIVERS, T. M.; SCHWENTKER, F. F. Encephalomyelitis Accompanied By Myelin Destruction Experimentally Produced in Monkeys. **Journal of Experimental Medicine**, v. 61, n. 5, p. 689–702, 1935.

RIVERS, T. M.; SPRUNT, D. H.; BERY, G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **Journal of Experimental Medicine**, v. 58, p. 39–53, 1933.

ROBERTS, O. L. et al. ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 19, p. 3413, 2010.

ROBICHON, K. et al. Clozapine reduces infiltration into the CNS by targeting migration in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2020.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. Statins Increase the Frequency of Circulating CD4 +

FOXP3 + Regulatory T Cells in Healthy Individuals. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. Atorvastatin Modulates Regulatory T Cells and Attenuates Cerebral Damage in a Model of Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 12, p. 152–162, 2017.

RONCHI, F. et al. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 β production by myeloid cells. **Nature Communications**, v. 7, n. May, 2016.

ROVIDA, E. et al. ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 1, p. 107–115, 2008.

SCHIFFENBAUER, J. et al. The induction of EAE is only partially dependent on TNF receptor signaling but requires the IL-1 type I receptor. **Clinical Immunology**, v. 95, n. 2, p. 117–123, 2000.

SCHRAML, B. U. et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T H 17 differentiation. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 405–409, 2009.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 636–645, 2009.

SOHN, S. J. et al. ERK5 MAPK Regulates Embryonic Angiogenesis and Acts as a Hypoxia-sensitive Repressor of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 43344–43351, 2002.

SOHN, S. J. et al. Transcriptional Regulation of Tissue-Specific Genes by the ERK5 Mitogen-Activated Protein Kinase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 19, p. 8553–8566, 2005.

SONG, J. et al. Inhibition of ROCK activity regulates the balance of Th1, Th17 and Treg cells in myasthenia gravis. **Clinical Immunology**, v. 203, n. May, p. 142–153, 2019.

SRIRAM, S. et al. This information is current as In vivo immunomodulation by monoclonal anti-CD4 antibody . II . Effect on T cell response to myelin basic protein and experimental

allergic encephalomyelitis . Why The JI ? Submit online . • Rapid Reviews ! 30 days * from su.

Journal of Immunology, v. 141, p. 464–468, 1988.

STONE, S. H. Transfer of allergic encephalomyelitis by lymph node cells in inbred guinea pigs.

Science, v. 134, p. 619–620, 1961.

STRITESKY, G. L.; YEH, N.; KAPLAN, M. H. IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 5948–5955, 2008.

STROMNES, I. M.; GOVERMAN, J. M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1810–1819, 2006.

SUTTON, C. et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1685–1691, 2006.

TAN, A. H.-M.; LAM, K.-P. Pharmacologic inhibition of MEK-ERK signaling enhances Th17 differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 4, p. 1849–57, 2010.

TANOUE, T. et al. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 110–116, 2000.

TEITELBAUM, D. et al. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. **Eur. J. Immunol.**, v. 1, p. 242–248, 1971.

TERASAWA, K.; OKAZAKI, K.; NISHIDA, E. Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. **Genes to Cells**, v. 8, p. 263–273, 2003.

TINTORE, M.; VIDAL-JORDANA, A.; SASTRE-GARRIGA, J. Treatment of multiple sclerosis — success from bench to bedside. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 1, p. 53–58, 2019.

TSIOUMPEKOU, M. et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of Erk5 MAP-kinase is dependent on Mek1/2, PKC and PI3-kinase, and affects BMP signaling.

Cellular Signalling, v. 28, n. 9, p. 1422–1431, 2016.

TUMORIGENESIS, B. et al. ERK5 Knockdown Generates Mouse Leukemia Cells with Low MHC Class I Levels That Activate NK Cells and. **Journal of Immunology**, v. 5, n. 16, p. 3398–3405, 2009.

VELDHOEN, M. et al. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179–189, 2006.

VELDHOEN, M. et al. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 43–49, 2009.

VIGLIETTA, V. et al. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 7, p. 971–979, 2004a.

VIGLIETTA, V. et al. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 7, p. 971–979, 2004b.

VOLLMER, T. et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Lancet**, v. 363, n. 9421, p. 1607–1608, 2004.

WADA, T.; PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene**, v. 23, n. 16 REV. ISS. 2, p. 2838–2849, 2004.

WANG, W. et al. Genetic Activation of ERK5 MAP Kinase Enhances Adult Neurogenesis and Extends Hippocampus-Dependent Long-Term Memory. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 2130–2147, 2014.

WANG, X. et al. Targeted Deletion of mek5 Causes Early Embryonic Death and Defects in the Extracellular Signal-Regulated Kinase 5/Myocyte Enhancer Factor 2 Cell Survival Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 1, p. 336–345, 2005.

- WANG, Y.; SU, B.; XIA, Z. Brain-derived Neurotrophic Factor Activates ERK5 in Cortical Neurons via a Rap1-MEKK2 Signaling Cascade. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 47, p. 35965–35974, 2006.
- WANKE, F. et al. Expression of IL-17F is associated with non-pathogenic Th17 cells. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 8, p. 819–829, 2018.
- WEI, L. et al. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 48, p. 34605–10, 2007.
- WEI, W. et al. Blocking A 2B Adenosine Receptor Alleviates Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Inhibition of IL-6 Production and Th17 Differentiation . **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 138–146, 2013.
- WEI, Z.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 2002.
- YAN, C. et al. Molecular Cloning of Mouse ERK5/BMK1 Splice Variants and Characterization of ERK5 Functional Domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 10870–10878, 2001.
- YANG, C. C. et al. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 20, p. 4771–4777, 1998.
- YANG, J. et al. Mek3 is essential for early embryonic cardiovascular development. **Nature Genetics**, v. 24, n. 3, p. 309–313, 2000.
- YANG, Q. et al. Article Pharmacological Inhibition of BMK1 Suppresses Tumor Growth through Promyelocytic Leukemia Protein. **Cancer Cell**, v. 18, n. 3, p. 258–267, 2010.
- YANG, X. O. et al. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9358–9363, 2007.
- YANG, X. O. et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . **Immunity**, v. 28, p. 29–39, 2008.

- YASUI, Y. et al. A lipophilic statin , pitavastatin , suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis. **Internacional Journal of Cancer**, v. 121, p. 2331–2339, 2007.
- YEDNOCK, T. et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 63–66, 1992.
- YONG, T.; MEININGER, G. A.; SCOTT LINTHICUM, D. Enhancement of histamine-induced vascular leakage by pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 45, n. 1–2, p. 47–52, 1993.
- ZHANG, X. et al. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORc in CD4+ lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 6988–6996, 2008.
- ZHOU, G.; BAO, Z. Q.; DIXON, J. E. Components of a New Human Protein Kinase Signal Transduction Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 12665–12669, 1995.
- ZHOU, L. et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 967–974, 2007.
- ZHOU, L. et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. **Nature**, v. 453, n. 7192, p. 236–40, 2008.
- ZHOU, W. et al. Inhibition of Rho-Kinase Downregulates Th17 Cells and Ameliorates Hepatic Fibrosis by Schistosoma japonicum Infection. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1262, 2019.
- ZHU, J.; GAO, B. Simvastatin combined with aspirin increases the survival time of heart allograft by activating CD4 + CD25 + Treg cells and enhancing vascular endothelial cell protection. **Cardiovascular Pathology**, v. 24, n. 3, p. 173–178, 2015.
- ZORN, E. et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1571–1579, 2006.

Anexos

Anexo I: Dados Suplementares

Figura suplementar 1. A deficiência de ERK5 não altera o número total de células ou a expressão de pSMAD2-3. O baço ou linfonodos (cervicais, braquiais, mesentéricos, axilares ou inguinais) foram coletados de animais deficientes para ERK5 em linfócitos T (ERK5^{f/f}CD4^{Cre}) ou do grupo controle (ERK5^{f/f}) para avaliar o número total de células. A) Número total de células no baço e linfonodos de animais *naive*. B) Número total de células nos linfonodos inguinais de animais submetidos a EAE (dia 5). C) Células CD4 *naive* foram isoladas, deixadas em *resting* por 5 horas e, posteriormente, estimuladas com TGF- β (30 ng/ml) por 30 minutos. Em seguida, os dados foram analisados por citometria de fluxo. Os dados estão representados em média $\pm$ E.P.M., n = 3 ou 5. Os dados foram analisados por test t de Student ou ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

Figura suplementar 2. Perfil da expressão de ERK5 e o seu papel na ubiquitinação de linfócitos T CD4. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{low} *naive* foram isolados do baço e linfonodos de animais C57BL/6 *naive* e cultivados sob condições polarizantes para Treg (TGF- β) ou Th17 (TGF- β +IL-6) na presença ou ausência de um inibidor de ERK5 (XMD 8-92: 3 μ M). A) e B) Em seguida as células foram coletadas nos tempos indicados com tampão RLT e β -mercaptoetanol para posterior extração de RNA, conversão a cDNA e realização de qPCR. C) Após 96 horas, as células foram coletadas em tampão RIPA com inibidor de proteases e fosfatases para avaliação da expressão proteica de ERK5 e ubiquitinação total por *western blot*. Os dados de qPCR foram representados em média $\pm$ E.P.M., n = 3. Células *naive fresh* foram utilizadas como grupo calibrador. Os dados foram normalizados pela expressão de Gapdh. Foi considerado estatisticamente significativo quando p < 0,05. Para o ensaio de *western blot*, foi utilizado um grupo sem citocinas (Th0) como controle. A β -actina foi utilizada como controle do carregamento proteico.

Anexo II: Aprovação do comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "Importância da via de sinalização dependente de ERK5 na diferenciação de linfócitos Th17 e Treg e no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental", registrado com o número **069/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de maio de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 246 camundongos C57Bl/6 oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 60 camundongos ERK5 F/F (Nº CTNBIO 030/97), 60 camundongos ERK5 F/F CD4 Cre (Nº CTNBIO 030/97), 60 camundongos PPARg F/F (Nº CTNBIO 030/97) e 60 camundongos PPARg F/F CD4 Cre (Nº CTNBIO 030/97), todos machos, pesando 22g e oriundos do Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/05/2017 a 30/01/2020.

We certify that the Protocol nº 069/2017, entitled "Role of the ERK5 dependent signalling pathway in the differentiation of Treg and Th17 cells and in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/29/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans) for research purposes, and includes the use of 246 C57Bl/6 mice from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 60 ERK5 F/F mice (Nº CTNBIO 030/97), 60 ERK5 F/F CD4 Cre mice (Nº CTNBIO 030/97), 60 PPARg F/F mice (Nº CTNBIO 030/97) and 60 PPARg F/F CD4 Cre mice (Nº CTNBIO 030/97), all of them weighing 22g from Animal House of the Department of Medicine of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 01/30/2020.

Ribeirão Preto, 29 de maio de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Anexo III: Prêmio de incentivo a pesquisa com citometria de fluxo

Anexo IV: Prêmio José Ribeiro do Valle

Anexo V: Manuscrito**Article type:** Original article**Title:** Pitavastatin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via Treg/Th17 balance**Authors:** PRADO, D.S.^{1,2}, DAMASCENO, L.E.A.^{1,2}, SONEGO, A.B.², FONSECA, M.D.M.³, CUNHA, T.M.^{1,2}, CUNHA, F.Q.^{1,2}, ALVES-FILHO, J.C.^{1,2}**Affiliations:**

1. Center for Research in Inflammatory Diseases, CRID, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, SP, Brazil.
2. Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
3. Department of Anesthesiology, Pain Mechanisms Laboratory, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA.

Corresponding author

Prof. Jose C. Alves-Filho. Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirao Preto, Sao Paulo 14049-900, Brazil. E-mail: jcafilho@usp.br; phone number: + 55 16 3315 3287; fax number: +55 16 3315 0220.

Abstract

Background: T regulatory cells (Treg) are responsible for control of homeostasis and have immunosuppressive function, while Th17 are the pathogenic cells that are able to produce pro-inflammatory cytokines, which lead to tissue damage. Thus, Treg and Th17 cells are critical on development of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis. Statins drugs have been used for the treatment of dyslipidemia and in the last years, it was found a potencial role of these drugs on inflammatory diseases. Thus, several works have attributed anti-inflammatory effects for statins, such as pitavastatin. **Methods:** Experimental autoimmune encephalomyelitis was induced through injection of an emulsion with MOG₃₅₋₅₅ and CFA in C57BL/6 mice. EAE was determined by clinical score, leukocyte infiltration, expression of molecules related with disease and cytokine production. Finally, naïve CD4 T cells were cultured to investigate the possible role of pitavastatin on Treg and Th17 differentiation. **Results:** We found that pitavastatin decreased the EAE development, which was characterized by reduction on EAE clinical score, expression of genes related with activation of cells from central nervous system (CNS) and Th17 response. Moreover, we observed that pitavastatin reduced the expression of IBA1 and pSTAT3^{Y705 and S727} at spinal cord. Thus, these results are explained by the reduction of Th17 cells and increase of Treg *in vivo*. Finally, we found that pitavastatin has direct effect on T cells, by increasing Treg and decreasing Th17 differentiation. Mechanistically, we found that pitavastatin effects are dependent of mevalonate synthesis. **Conclusion:** We described a novel role of pitavastatin as an immunomodulator during EAE by controlling Th17 and Treg differentiation, via mevalonate synthesis.

Keywords: Pitavastatin, EAE, Neuroinflammation, Multiple sclerosis, T cell, Th17, Treg.

Background

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease characterized by demyelination, inflammation and neurodegeneration, which is featured by the leukocyte infiltration at central nervous system

(CNS) (MCFARLAND; MARTIN, 2007; RAINE; PH; SC, 2006). Among these leukocytes, CD4 T cells play a critical role at development of MS and in its animal model, which it is known as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (FLETCHER et al., 2010; KUCHROO et al., 2002; SRIRAM et al., 1988). Two subtypes of those T cells, T regulatory (Treg) and Th17 cells display opposite roles in this disease, while Th17 cells are inflammatory cells responsible to blood brain barrier (BBB) disruption, Treg cells are important to perform a negative regulation in inflammatory cells, such as Th17 cells (KEBIR et al., 2007; KOHM et al., 2002b; VIGLIETTA et al., 2004b; YANG et al., 2008). Thus, the balance between Treg and Th17 cells is a potential target for the development of new therapeutic approaches.

Akira Endo discovered Statins drugs in 1976, as molecules that are able to reduce cholesterol synthesis, via HMG-CoA reductase inhibition (ML- et al., 1976). Thus, they have been used for the treatment of hypercholesterolemia. Nevertheless, statins drugs are candidates for the treatment of some inflammatory diseases. Indeed, Pitavastatin was able to reduce colon inflammation in a model of colitis (YASUI et al., 2007) and to reduce IL-8 production in HUVEC cells, much more than compared with other statin drug (atorvastatin) (MORIKAWA et al., 2002). Moreover, statins are in general able to reduce the production pro-inflammatory cytokines, such as IL-17, TNF- α and IL-21 *in vivo* (ELLER et al., 2010; LI et al., 2011; RODRÍGUEZ-PEREA et al., 2015).

Interestingly, there are evidences that statins could control Treg and Th17 differentiation in some animal models (FORERO-PENÑA; GUTIERREZ, 2013; LI et al., 2011; MENG et al., 2012; ZHU; GAO, 2015). However, these studies are not enough to determine a direct effect of these drugs on T cell differentiation or on autoimmune diseases progression. Therefore, the role of statins, such as pitavastatin on regulation of Treg and Th17 cells as well as on autoimmune disease development remains unclear.

In the present study, we investigated the off-label role of pitavastatin in the development of EAE. We found that Pitavastatin increases and decreases Treg and Th17 differentiation, respectively, during EAE. Moreover, these data were related with the balance of Treg and Th17 cells. In vitro studies revealed that pitavastatin decreased Treg and increased Th17 differentiation, demonstrating a direct effect of pitavastatin on CD4 T cells. Mechanistically, pitavastatin mediated Treg and Th17 differentiation via the mevalonate synthesis. These data demonstrated that pitavastatin has anti-inflammatory effects in a model of multiple sclerosis by Treg and Th17 modulation.

Methods

Mice

Male C57Bl/6 mice, 6 or 10 week-old were purchased from Ribeirão Preto Medical School. The animals were housed in a pathogenic-free animal facility under controlled temperature (22–25°C), with 12 hours light-dark cycle and provided with water and food ad libitum. All experiments were performed in accordance with protocols approved by the Ethics Committee on Animal Use of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (protocol: 69/2016).

EAE induction and Pitavastatin treatment

Mice were immunized by subcutaneous route in the flanks with 300 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Proteimax), emulsified with CFA (5 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* – Complete Freund's Adjuvant - Sigma Aldrich). On day 0 and 2, the animals were treated, by intraperitoneal route, with pertussis toxin (200 ng/mouse - Sigma Aldrich). The mice were treated with vehicle (Saline) or Pitavastatin (1, 3 or 10 mg/kg - Patheon), every day, by oral route, from day 0. The clinical score was measured daily up to 25 post-immunization. The measurement was scored as described 0 = no symptoms, 0.5 = partial limp tail, 1 = paralyzed tail, 1.5 = loss in coordinated movements, 2 = hind limb paresis, 2.5 = one hind limb paralyzed, 3 = both hind limbs paralyzed, 3.5 = hind limbs paralyzed and weakness in forelimbs, 4 = one forelimb paralyzed, 4.5 = both forelimbs paralyzed, and 5 = moribund/death. The highest score founded was 3.5. Thereby, the mice were not sacrificed before the end of the experiment.

Histology and immunofluorescence

At peak of disease, the spinal cords were harvested after transcardiac perfusion with PBS and PFA 4%. Then, the tissues were post-fixed overnight with PFA 4%. The spinal cords sections (20 µM) were stained with HE (hematoxylin and eosin) and Fluoromyelin green (Thermo Scientific). The sections were acquired with a fluorescent microscope (Leica).

Quantitative real-time PCR analysis

The Spinal cords were collected at peak of disease and the RNA was extracted using Trizol reagent (Sigma Aldrich) and converted to cDNA, using High-Capacity cDNA reverse transcription Kit (Thermo Scientific). The qPCR was performed using SYBR green PCR master mix (Thermo Scientific) and the experiments were performed in the StepOnePlus machine (Thermo Scientific). Gene expression was determined relative to Gapdh and fold change calculated by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ threshold cycle method. Naïve mice were used as the calibrator group. All genes analyzed and their sequences are presented in the table 1.

Table 1: Genes analyzed by qPCR and primers used.

Gene name	Forward	Reverse
Ccr2	GGCATTGGATTACACAT	CAAGGCTCACCATCATCGTA
Cx3cr1	GCCTCTGGTGGAGTCTGCGTG	CGCCCAAATAACAGGCCTCAGCA
Aif1	TGAGGAGCCATGAGCCAAAG	GCTTCAAGTTTGGACGGCAG
Gfap	AGGGCGAAGAAAACCGCATCACC	TCTAAGGGAGAGCTGGCAGGGCT
Il17a	GCTCCAGAAGGCCCTCAG	CTTCCCTCCGCATTGACA
Csf2	TTTACTTTTCCTGGGCATTG	TAGCTGGCTGTCATGTTCAA
Il21	TCATTGACCTCGTGGCCC	ATCGTACTTCTCCACTTGCAATCC
Gapdh	CATCTTCTTGTGCAGTGCCA	CGGCCAAATCCGTTTAC

Western blot analysis

The spinal cords were collected at peak of disease with RIPA buffer (Sigma Aldrich) plus protease and phosphatase inhibitors (Cell Signaling). The amount of protein in the samples was determined using bicinchoninic acid (BCA – Sigma Aldrich) protein assay reagent kit. The lysates (10 ug/slot) were separated by electrophoresis and then transferred to nitrocellulose

membrane (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk (Cell signaling) in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBST) for 1 h at room temperature and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against IBA1, STAT3 and pSTAT3^{Y705 or S727} (1:1000; Cell Signaling). Subsequently, membranes were washed with TBST and incubated for 2 h with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (anti-rabbit; 1:5000 dilution; Sigma Aldrich). The reactivity was detected using the ECL prime reagent (GE Healthcare) and then chemiluminescence signal recorded on the ChemiDoc XRS Imager (Bio-Rad Laboratories). Data were acquired with Image Lab software (Bio-Rad Laboratories). Gapdh was used as loading control.

Recall

Mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ and the lymph nodes were harvested (on day 5 after immunization) and the cells (lymph nodes cells) were restimulated with MOG₃₅₋₅₅ (20 ng/ml) plus Th17 cocktail (TGF-β (2.5 ng/ml – Thermo Scientific), IL-6, IL-1β and IL-23 (20 ng/ml for all of them – R&D Systems) and cultured for 96 hours. Subsequently, the cells were stained with viability probe, αCD4, αRORγt and αIL-17A (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry. The cytokines production in the supernatant was measured by ELISA.

ELISA

ELISA following the manufacturers' instruction (R&D Systems) of supernatant from recall assay and culture of Th17 cells determined the concentration of IL-17 and GM-CSF. Results were expressed as pg/ml.

***In vitro* CD4⁺ T cell differentiation**

Naïve CD4⁺CD25⁻CD44^{low} T cells were purified from lymph nodes and spleen of wild-type C57BL/6, with CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotech), by using an AutoMACS magnetic cell sorter (Miltenyi Biotech) according to the manufacturer's protocol. Purified cells were activated with coated anti-CD3 and soluble anti-CD28 (anti-CD3: 4 µg/mL; anti-CD28: 2

μg/mL BD Biosciences) on flat-bottomed plates (1 x 10⁵/well) for Th17 cells or coated with anti-CD3 and anti-CD28 (both 2 μg/mL; BD Biosciences) on flat-plates (1 x 10⁵/well) for Treg cells. Skewing conditions were as follows: Th17: 2.5 ng/mL rhTGF-β1 (eBioscience) plus 20 ng/mL rmIL-6 (R&D Systems) and for iTreg polarization was used 1 ng/mL rhTGF-β1 (Thermo Scientific). Pitavastatin (Patheon) was used at 0.1, 0.3 or 1 μM. Mevalonate (Sigma Aldrich) was used at 1 mM.

Flow Cytometry

For IL-17A staining, cells were stimulated in complete culture medium with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/mL; Sigma Aldrich) and ionomycin (500 ng/mL; Sigma Aldrich) for 4 hours in the presence of monensin (GolgiStop 1.5 μl/mL; BD Biosciences) at 37 °C. Subsequently, the cells were washed and stained for 10 min at room temperature, with fixable viability dye (Thermo Scientific), for dead cells exclusion, and αCD4. Afterwards, cells were fixed and permeabilized (15 min) using eBioscience Transcription Factor Fixation/Permeabilization kit, it followed by intracellular staining with monoclonal antibodies (αIL-17A, αRORγt or αFoxP3) for 15 min. Intracellular staining of Tregs was done without PMA/ionomycin stimulation. The data were acquired on FACSVerse machine (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo X software (BD Biosciences).

Statistics

Statistical analyses among the groups were performed with one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. For EAE experiments was used two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test. Results are expressed as means ± S.E.M.. The experiments were repeated at least two times. P < 0.05 was considered statistically significant. GraphPad Prism 8.0 software was used for statistical analysis.

Results

Pitavastatin treatment reduces EAE development

To address the potential role of pitavastatin on treatment of autoimmune diseases, We first investigated its therapeutical potencial on EAE development. We used three different doses of pitavastatin and we found that at doses of 3 and 10 mg/kg were effective in reduce or delay the clinical score of EAE (Fig. 1A). However, after the day 20 post-immunization the dose of 3 mg/kg was not effective anymore. Therefore, in the next experiments, we just used the highest dose, which decreased clinical score and the EAE incidence (Fig. 1B and C). Moreover, histopathological analyzes demonstrated that pitavastatin treatment reduced leukocyte infiltration (Fig. 1D) into spinal cord as well as decreased myelin degeneration (Fig. 1E), which is a hallmark of MS and EAE.

IBA1 and pSTAT3^{Y705} and ^{S727} expression are decreased after pitavastatin treatment

In order to confirm the data obtained from clinical score and histology, we investigated the expression of molecules that are upregulated in EAE, which are expressed in cells from CNS or in the infiltrating leukocytes. First, we investigated by qPCR the expression of *Ccr2*, *Cx3cr1*, *Aif1* (IBA1) and *Gfap*. As well as established, all of these genes are upregulated at peak of disease at spinal cord in EAE-bearing mice, when compared with naïve mice (Fig. 2A). In line, IBA1 protein expression is also increased (Fig. 2B). Consistently with reduction on EAE clinical score, pitavastatin treatment reduced *Ccr2*, *Cx3cr1*, *Aif1* and *Gfap* expression, as well as IBA1 expression (Fig. 2).

To obtain another confirmation that there is a decreasing of leukocyte infiltration in the spinal cord, we investigated the expression of Th17-related genes and the expression of pSTAT3^{Y705} and ^{S727}, which is a critical transcription factor on Th17 differentiation. We found an increase of *Il17a*, *Csf2* and *Il21* expression in EAE group (Fig. 3A). Moreover, pitavastatin treatment

reduced their expression. In order to confirm these data, we investigated pSTAT3 expression, which is a critical transcription factor of Th17 cells. Pitavastatin treatment clearly reduced pSTAT3 expression in two different residues, Y705 and S727 (Fig. 3B and C). The phosphorylation at Y705 is related with nuclear translocation, while the S727 is associated with its activation. Together, these data suggest that leukocytes are not reaching the CNS, which is explained by a modulation on the leukocyte migration or in the activation of T cells in the periphery.

Pitavastatin treatment modulates Treg and Th17 differentiation *in vivo*

Different works claim that statins drugs are able to increase Treg and decrease Th17 cells numbers (LI et al., 2011; MENG et al., 2012; RODRÍGUEZ-PEREA et al., 2015, 2017). In line, the modulation of these two cell types is an interest target for the treatment of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis (GOVERMAN, 2009; LEGROUX; ARBOUR, 2015). Thus, to investigate if pitavastatin treatment reduced leukocyte infiltration on the CNS because a possible modulation on the periphery of CD4 T cells, we investigated Treg and Th17 cells during EAE development, at 5 days post-immunization in the draining lymph nodes. EAE-bearing mice displayed more Th17 cells than naïve mice, as expected, and pitavastatin treatment reduced Th17 differentiation *in vivo* (Fig. 4A). We just found a mild increase of Treg cells in pitavastatin group when compared with vehicle (Fig. 4B). Then, to investigate the Th17 antigen-specific response, we performed an antigen-specific T-cell response assay with lymph nodes cells. The immunization clearly induced MOG₃₅₋₅₅ specific-T cells, which when cultured with the antigen and cytokines cocktail to Th17 differentiation displayed high IL-17 production and ROR γ t expression. In line, lymph nodes cells from pitavastatin group displayed reduction on Th17 differentiation when cultured *in vitro* when compared with EAE group (Fig. 4C), which indicates that pitavastatin treatment reduced the generation of an antigen-specific T cell

response. We also found that pitavastatin reduced IL-17 and GM-CSF production during antigen-specific T-cell response in supernatant of culture (Fig. supp. 1).

Pitavastatin modulates Treg and Th17 differentiation *in vitro* via mevalonate synthesis

To assess whether there is a direct effect of pitavastatin on T cells, we investigated its effect on Treg and Th17 differentiation *in vitro*. We found that pitavastatin increased Treg (Fig. 5A) differentiation and reduced Th17 differentiation (Fig. 5 B and Fig. supp. 2), which demonstrates that this drug act on CD4 T cells, modulating Treg and Th17 differentiation. Maybe pitavastatin could control T cell differentiation *in vivo*, by also modulation of other cell types, such as dendritic cells, however we claim here that pitavastatin has a direct effect on CD4 T cells. Statins drugs inhibit mevalonate production and consequently cholesterol synthesis, which explain why they are used for the treatment of dyslipidemia. Therefore, we investigated if mevalonate synthesis is important for pitavastatin effect on Th17 and Treg cell differentiation. We found that mevalonate, by itself, had no effect on Treg or Th17. However, it abolished pitavastatin effects on CD4 T cell differentiation (Fig. 6A, 6B and sup. 3). Nevertheless, why mevalonate synthesis is important for Treg and Th17 is not clear. Thereby, these data indicate that pitavastatin treatment reduces EAE development by modulation of Treg and Th17, which is dependent of mevalonate synthesis.

Discussion

The molecular mechanisms that contribute for pathogenesis of multiple sclerosis remain unclear. However, the role of CD4 T cells and specifically of the Th17 and Treg cells is well established. For instance, *Il17* expression is higher in PBMC or cerebrospinal fluid from patients with MS than in healthy individuals. Moreover, patients in relapsing display more *Il17* expression than those in remission phase (MATUSEVICIUS et al., 1999). In line, Treg are less suppressive in patients with MS than controls (VIGLIETTA et al., 2004a). Therefore, the identification of drugs that could modulate Th17 and Treg cells differentiation or response is a possible alternative for the treatment of MS.

Some evidences have shown that different drugs have been used for another proposal than that initial one. This is called of off-label effect, which is quite interesting because is easier to use a known drug to treat another disease, than to find a new molecule and to investigate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of this new compound. Besides the benefits of off-label use, there are some risks and they must be regulated (MELLO et al., 2009; PATSY, B.M., RAY, 2008). Some reports have shown an anti-inflammatory effect of different classes of drugs, which are predicted to work as anti-dyslipidemic, anti-psychotic, chemotherapeutic agent for cancers and other (CRONSTEIN; NAIME; OSTAD, 1993; ROBICHON et al., 2020; VOLLMER et al., 2004). Among then, statins drugs are been used for the treatment of dyslipidemia and recently many reports suggest a possible off-label effect of these drugs on the treatment of inflammatory diseases. The anti-inflammatory effects are been observed in different animal models, such as colitis, neuritis, myasthenia gravis and glomerulonephritis (CÔTÉ-DAIGNEAULT et al., 2016; ELLER et al., 2010; LI et al., 2011, 2013; YASUI et al., 2007). In the present study, we found that pitavastatin reduced the development of EAE, suggesting an immunomodulator feature. Interestingly, other statin drug (simvastatin) reduced the volume of lesions and the emergence of new ones in patients with relapsing-remitting

multiple sclerosis (RRMS) (VOLLMER et al., 2004). However, they did not show any possible mechanism, but they did not find any difference on the population of Th1 and Th2 cells. Certainly, Th17 cells were not investigated because they were discovered one year after this publication (HARRINGTON et al., 2005).

Some studies found that simvastatin and atorvastatin are able to increase Treg numbers and reduce Th17 cells in different animal models of inflammatory diseases (CÔTÉ-DAIGNEAULT et al., 2016; ELLER et al., 2010; LI et al., 2011; MENG et al., 2012; ZHU; GAO, 2015). Our analysis of Treg and Th17 cells *in vivo* suggested the role of pitavastatin on T cell differentiation, but until here, we could not claim a direct effect of pitavastatin on CD4 T cells. Treg and Th17 cells are critical on EAE development. Indeed, the deficiency of genes related with Th17 cells, such as *Rorc*, *Rora*, *Il17a*, *Il23r* and *Il21* leads to reduction on the EAE clinical score (HAINES et al., 2013; KOMIYAMA et al., 2006b; LANGRISH et al., 2005; MCGEACHY et al., 2009; NURIEVA et al., 2007; YANG et al., 2008). While, the transfer of Tregs suppress EAE development (KOHM et al., 2002b). Therefore, the pharmacological modulation of Treg and Th17 cells is a great target for the treatment of autoimmune diseases. Pitavastatin reduces Th17 differentiation, while it increased the Treg differentiation. Thereby, this can explain why this drug was able to reduce EAE clinical score and suggest that Pitavastatin, as well as other statins drugs could be used for the treatment of autoimmune disease, such as MS.

By examining a possible direct role of pitavastatin on CD4 T cells, we found that pitavastatin reduced Th17 and increased Treg differentiation *in vitro*, which is also true for simvastatin (on Treg) and atorvastatin (on Th17 cells) (KAGAMI et al., 2009; KIM; KIM; SHEVACH, 2010; ZHANG et al., 2008). These data suggest statins drugs in general could modulate Th17 and Treg differentiation. Indeed, mevalonate reverses pitavastatin effects and the same occurs for other statins. Thus, mevalonate synthesis is critical for statins effects, even in inflammatory

diseases. As mentioned before, simvastatin reduced the lesions in patients with RRMS, by an unclear mechanism (VOLLMER et al., 2004). We suggest here that pitavastatin attenuated EAE by modulation of Treg and Th17 differentiation, which could also explain simvastatin effects, since that the inhibition of mevalonate synthesis is shared among all of statins, and its production was critical for pitavastatin effects.

Thus, how mevalonate might control these effects remains unknown. A possible mechanism could be dependent of protein geranylgeranylation, but not farnesylation, two processes that are downstream of mevalonate and upstream of the cholesterol synthesis. In line, farnesyl pyrophosphate is related to cholesterol synthesis, while geranylgeranyl pyrophosphate is associated with some signaling pathways, such as Rho/ROCK (AGABITI; LI; WIEMER, 2017; HIRAI et al., 1997; KAGAMI et al., 2009; MURTHY; TONG; HOHL, 2005). Interestingly, Rho/ROCK inhibition downregulates Th17 differentiation and increases Treg differentiation in myasthenia gravis and *Shistosoma* infection (SONG et al., 2019; ZHOU et al., 2019). Moreover, Rho inhibition decreased pSTAT3 and increased pSTAT5 expression (SONG et al., 2019). Mechanistically, statins drugs could modulate Treg and Th17 differentiation via Rho pathway by modulation of STAT3 and STAT5, which are critical transcriptions factor for Th17 and Treg cells, respectively.

In conclusion, we have discovered an off-label effect of pitavastatin as an immnomodulator by reducing EAE development and modulating the Treg and Th17 differentiation via mevalonate synthesis. Therefore, pitavastatin could be effective in the treatment of autoimmune diseases, such as MS.

Abbreviations

BBB, Blood brain-barrier; **CNS**, Central nervous system; **EAE**, Experimental autoimmune encephalomyelitis; **GFAP**, Glial fibrillary acidic protein; **IBA1**, ionized calcium-binding

adaptor molecule 1; **MOG**, Myelin oligodendrocyte glycoprotein; **MS**, Multiple sclerosis; **RRMS**, relapsing-remitting multiple sclerosis; **ROCK**, Rho-associated protein kinase; **Th**, T helper; **Treg**, Regulatory T cells;

Acknowledgements

We thank Ieda R.S. Schivo, Sérgio R. Rosa, Marcos Antônio, Ana Kátia dos Santos for technical support.

Author's contributions

D.S.P. planned, performed and analysed murine experiments and wrote the manuscript. J.C.A.F. planned experiments and wrote the manuscript. L.E.A.D., A.B.S. and M.D.M.F. performed and analyzed experiments. T.M.C. and F.Q.C provided reagents.

Funding

This work was supported by grants from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant agreements, number 2013/08216-2 (Center for research in Inflammatory Diseases).

Availability of data and materials

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All of the experiments were performed according to the ethical guidelines of the Animal welfare committee of the Ribeirão Preto Medical School, Brazil (licence number: 69/2017).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- ABBAS, A. K. et al. Regulatory T cells : recommendations to simplify the nomenclature. **Nature Immunology**, v. 14, n. 4, p. 307–308, 2013.
- AGABITI, S. S.; LI, J.; WIEMER, A. J. Geranylgeranyl diphosphate synthase inhibition induces apoptosis that is dependent upon GGPP depletion , ERK phosphorylation and caspase activation. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2017.
- AGGARWAL, S. et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1910–1914, 2003.
- AGRAWAL, A. et al. ERK1 $-/-$ Mice Exhibit Th1 Cell Polarization and Increased Susceptibility to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis . **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 10, p. 5788–5796, 2006.
- ANANIEVA, O. et al. ERK5 regulation in naïve T-cell activation and survival. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 9, p. 2534–47, 2008.
- BADSHAH, I. I.; BAINES, D. L.; DOCKRELL, M. E. Erk5 is a mediator to TGFB1-induced loss of phenotype and function in human podocytes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 APR, n. April, p. 1–11, 2014.
- BASU, R. et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the Th17 cell–iTreg cell balance. **Nature Immunology**, v. 16, n. 3, p. 286–95, 2015.
- BEIER, U. H. et al. Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3+ T-regulatory cell function and allograft survival. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 6, p. 2315–2326, 2015.
- BENNETT, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 20–21,

2001.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 345–350, 2007.

BRERETON, C. F. et al. Inhibition of ERK MAPK Suppresses IL-23- and IL-1-Driven IL-17 Production and Attenuates Autoimmune Disease. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 1715–1723, 2009.

BROWNE, J. A. et al. TGF-beta activates ERK5 in human renal epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 3, p. 440–4, 2008.

BRUNKOW, M. E. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 68–73, 2001.

BURCHILL, M. A. et al. IL-2 Receptor-Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3+ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 1, p. 280–290, 2007.

BUSCHBECK, M.; ULLRICH, A. The Unique C-terminal Tail of the Mitogen-activated Protein Kinase ERK5 Regulates Its Activation and Nuclear Shuttling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 2659–2667, 2005.

CAO, J. et al. Cyclic AMP suppresses TGF- β -mediated adaptive Tregs differentiation through inhibiting the activation of ERK and JNK. **Cellular Immunology**, v. 285, n. 1–2, p. 42–48, 2013.

CHEN, W. et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-B Induction of Transcription Factor Foxp3. **Journal of**

Experimental Medicine, v. 198, n. 12, p. 1875–1886, 2003.

CHEN, Z. et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 21, p. 8137–8142, 2006.

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

COHEN, J. A. et al. Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 5, p. 402–415, 2010.

CONSTANTINESCU, C. S. et al. Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 9, p. 5097–5104, 1998.

CONSTANTINESCU, C. S. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, 2011.

COPSEL, S. N. et al. BET bromodomain inhibitors which permit treg function enable a combinatorial strategy to suppress GVHD in pre-clinical allogeneic HSCT. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, p. 1–13, 2019.

COSTANTINO, C. M.; BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D. A. Multiple sclerosis and regulatory T cells. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, n. 6, p. 697–706, 2008.

CÔTÉ-DAIGNEAULT, J. et al. Potential Immunomodulatory Effects of Statins in Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 3, p. 724–732, 2016.

CRONSTEIN, B. N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The Antiinflammatory Mechanism of Methotrexate. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. December, p. 2675–2682, 1993.

CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for

autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 744–748, 2003.

DE ROSBO, N. K. et al. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 6, p. 2602–2608, 1993.

ELLER, P. et al. Atorvastatin attenuates murine anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 77, n. 5, p. 428–435, 2010.

ESPARIS-OGANDO, A. et al. Erk5 Participates in Neuregulin Signal Transduction and Is Constitutively Active in Breast Cancer Cells Overexpressing ErbB2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 1, p. 270–285, 2002.

EUGSTER, H. PIETRO et al. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 7, p. 2178–2187, 1998.

EYLAR, E. H. et al. Experimental allergic encephalomyelitis: Synthesis of disease-inducing site of the basic protein. **Science**, v. 168, n. 3936, p. 1220–1223, 1970.

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

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 330–336, 2003.

FORERO-PENÑA, D. A.; GUTIERREZ, F. R. S. Statins as Modulators of Regulatory T-Cell Biology. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

FOX, R. J. et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 12, p. 1087–1097, 2012.

GARAUDE, J. et al. ERK5 activates NF- κ B in leukemic T cell and is essential for their growth in vivo. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 7609–7617, 2006.

GHORESCHI, K. et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 967–971, 2010.

GIJBELS, K. et al. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. **Molecular Medicine**, v. 1, n. 7, p. 795–805, 1995.

GIURISATO, E. et al. Myeloid ERK5 deficiency suppresses tumor growth by blocking protumor macrophage polarization via STAT3 inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 12, p. E2801–E2810, 2018.

GOLD, R. et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 12, p. 1098–1107, 2012.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 6, p. 393–407, 2009.

HAINES, C. J. et al. Report Autoimmune Memory T Helper 17 Cell Function and Expansion Are Dependent on Interleukin-23. **Cell Reports**, v. 3, n. 5, p. 1378–1388, 2013.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17–producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1123–1132, 2005.

HARRIS, T. J. et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in Th17 development and Th17-dependent autoimmunity. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 4313–4317, 2007.

HART, B. A.; GRAN, B.; WEISSERT, R. EAE: Imperfect but useful models of multiple sclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 3, p. 119–125, 2011.

HAUSER, S. L. et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis.

New England Journal of Medicine, v. 358, n. 7, p. 676–688, 2008.

HAUSER, S. L. et al. Ocrelizumab versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis.

New England Journal of Medicine, v. 376, n. 3, p. 221–234, 2017.

HAVRDOVÁ, E. et al. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. **Journal of Neurology**, v. 263, n. 7, p. 1287–1295, 2016.

HAYASHI, M. et al. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 8, p. 1138–1148, 2004.

HIRAI, A. et al. Geranylgeranylated Rho Small GTPase (s) Are Essential for the Degradation of p27 Kip1 and Facilitate the Progression from G 1 to S Phase in Growth- stimulated Rat FRTL-5 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 13–16, 1997.

HOFSTETTER, H. H. et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cellular Immunology**, v. 237, n. 2, p. 123–130, 2005.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, p. 1057–1061, 2003.

HUBER, S. et al. P38 MAP kinase signaling is required for the conversion of CD4+CD25- T cells into iTreg. **Plos One**, v. 3, n. 10, p. 1–7, 2008.

ICHIYAMA, K. et al. Foxp3 inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17003–17008, 2008.

IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17 + T Helper Cells. **Cell**, v. 126, p. 1121–1133, 2006.

JACOBS, L. Intrathecal interferon reduces exacerbations of Multiple Sclerosis. **Science**, v. 27, p. 1026–1028, 1981.

JÄGER, A. et al. Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7169–7177, 2009.

JETTEN, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development , immunity , circadian rhythm , and cellular metabolism. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 7, p. 1–32, 2009.

JOHNSON, K. P. et al. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. **Neurology**, v. 50, n. 3, p. 701–708, 1998.

KABAT, A.; WOLF, A.; BEZER, A. E. Rapid Production of Acute Disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. **Science**, v. 104, p. 362–363, 1946a.

KABAT, E. A.; WOLF, A.; BEZER, A. E. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. **Journal of Experimental Medicine**, v. 85, p. 1331–1340, 1946b.

KAGAMI, S. et al. Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th 17 cells and Foxp3+ regulatory T cells. **International Immunology**, v. 21, n. 6, p. 679–689, 2009.

KAMAKURA, S.; MORIGUCHI, T.; NISHIDA, E. Activation of the Protein Kinase ERK5 / BMK1 by Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26563–26571, 1999.

KAPPOS, L. et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study.

The Lancet, v. 372, n. 9648, p. 1463–1472, 2008.

KASLER, H. G. et al. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 22, p. 8382–9, 2000.

KATO, Y. et al. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 23, p. 7054–7066, 1997.

KATO, Y. et al. Bmk1/ERK5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. **Nature**, v. 395, p. 713–716, 1998.

KATO, Y. et al. Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18534–18540, 2000.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1173–1175, 2007.

KESAVAN, K. et al. MEKK2 Regulates the Coordinate Activation of ERK5 and JNK in Response to FGF-2 in Fibroblasts. **Journal of Cellular Physiology**, v. 199, n. 1, p. 140–148, 2004.

KIES, M. W.; MURPHY, J. B.; ALVORD, E. C. Fractionation of guinea pig brain proteins with encephalitogenic activity. **Federation Proceedings**, v. 19, p. 207, 1960.

KIM, S.; LIM, J. H.; WOO, C. H. ERK5 inhibition ameliorates pulmonary fibrosis via regulating Smad3 acetylation. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 6, p. 1758–1768, 2013.

KIM, Y. C.; KIM, K. K.; SHEVACH, E. M. Simvastatin induces Foxp 3 + T regulatory cells by modulation of transforming growth factor- b signal transduction. **Immunology**, v. 130, p. 484–493, 2010.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.; TYLER, K. L. Progressive Multifocal

Leukoencephalopathy Complicating Treatment with Natalizumab and Interferon Beta-1a for Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 369–74, 2005.

KNOCHELMANN, H. M. et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 5, p. 458–469, 2018.

KOHM, A. P. et al. Cutting Edge: CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 4712–4716, 2002a.

KOHM, A. P. et al. Cutting Edge: CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 4712–4716, 2002b.

KOIZUMI, S. ICHI et al. JunB regulates homeostasis and suppressive functions of effector regulatory T cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 1, p. 566–573, 2006a.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 566–573, 2006b.

KONDOH, K. et al. Regulation of Nuclear Translocation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 by Active Nuclear Import and Export Mechanisms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 5, p. 1679–1690, 2006.

KORN, T. et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 4, p. 423–431, 2007a.

KORN, T. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 484–487, 2007b.

KORN, T. et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3⁺ regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 47, p. 18460–18465, 2008.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 485–517, 2009.

KUCHROO, V. K. et al. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): Role of Self and Cross-Reactive Antigens in Shaping , Tuning , and Regulating the Autopathogenic T Cell Repertoire. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 101–123, 2002.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–240, 2005.

LE, N. et al. Identification of Activators of ERK5 Transcriptional activity by High-Troughput Screening and the role of Endothelial ERK5 in Vasoprotective Effects Induced by statins and antimalarial agents. **Journal of immunology**, v. 193, n. 7, p. 3803–3815, 2014.

LEBSON, L. et al. Cutting Edge: The Transcription Factor Kruppel-Like Factor 4 Regulates the Differentiation of Th17 Cells Independently of ROR γ t. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7161–7164, 2010.

LEE, JIING-DWAN, ULEVITCH, R.J., HAN, J. Primary Structure of BMK1: A new mammalian MAP Kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 213, n. 2, p. 715–724, 1995.

LEE, J. M.; OLITSKY, P. K. Simple Method for Enhancing Development of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Mice. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 89, n. 2, p. 263–266, 1955.

LEE, Y. et al. Induction and molecular signature of pathogenic Th17 cells. **Nature Immunology**, v. 13, n. 10, p. 991–999, 2012.

LEGROUX, L.; ARBOUR, N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes : An Entangled Story. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 10, p. 528–546, 2015.

LEHMANN, P. V et al. Spreading of Tcell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. **Nature**, v. 358, n. July, p. 155–157, 1992.

LEONARD, J. P.; WALDBURGER, K. E.; GOLDMAN, S. J. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 1, p. 381–386, 1995.

LI, D. et al. A Phase II study of the safety and efficacy of teriflunomide in multiple sclerosis with relapses. **Neurology**, v. 66, p. 894–900, 2006.

LI, X. et al. Atorvastatin ameliorates experimental autoimmune neuritis by decreased Th1 / Th17 cytokines and up-regulated T regulatory cells. **Cellular Immunology**, v. 271, n. 2, p. 455–461, 2011.

LI, X. et al. Molecular and Cellular Neuroscience Atorvastatin-modified dendritic cells in vitro ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated Treg cells and shifted Th1 / Th17 to Th2 cytokines. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 56, p. 85–95, 2013.

LIN, E. C. K. et al. ERK5 kinase activity is not required for cellular immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 42, p. 11865–11870, 2016.

LINDSEY, J. W. EAE: History, clinical signs, and disease course. **Experimental Models of Multiple Sclerosis**, p. 1–9, 2005.

LININGTON, C. et al. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 6, p. 1364–1372, 1993.

LINTHICUM, D. S.; MUNOZ, J. J.; BLASKETT, A. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. **Cellular Immunology**, v. 73, n. 2, p. 299–310, 1982.

LIU, H. et al. ERK differentially regulates Th17- and Treg-cell development and contributes to the pathogenesis of colitis. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 7, p. 1716–1726, 2013.

LIU, L. et al. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 8532–8537, 2003.

LIU, W. et al. Metabolic stress-induced cardiomyopathy is caused by mitochondrial dysfunction due to attenuated Erk5 signaling. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 494, 2017.

LUBLIN, F. D. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. **Neurology**, v. 96, p. 907–911, 1996.

LUIZ, J. P. M. Estudo da participação da via de sinalização dependente de ERK5 na polarização de macrófagos M2 induzida por IL-4. **Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada), Universidade de São Paulo**, p. 90, 2015.

LÜNEMANN, J. D. et al. Immune reconstitution therapies: concepts for durable remission in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 56–62, 2020.

LUO, X. et al. Cutting Edge: TGF- β -Induced Expression of Foxp3 in T cells Is Mediated through Inactivation of ERK. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 2757–2761, 2015.

MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 2006.

MARCHETTI, A. et al. ERK5/MAPK is activated by TGF β in hepatocytes and required for the GSK-3 β -mediated Snail protein stabilization. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 11, p. 2113–2118, 2008.

MARTIN, D.; NEAR, S. L. Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 61, n. 2, p. 241–245, 1995.

MATUSEVICIUS, D. et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 5, p. 101–104, 1999.

MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 913–919, 2007.

MCGEACHY, M. J. et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17 – producing effector T helper cells in vivo. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 314–324, 2009.

MCMAHON, E. J. et al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 335–339, 2005.

MELE, D. A. et al. BET bromodomain inhibition suppresses TH17-mediated pathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 11, p. 2181–2190, 2013.

MELLO, M. M. et al. Shifting Terrain in the Regulation of Off-Label Promotion of Pharmaceuticals. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1557–1566, 2009.

MENDEL, I. et al. Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: A study in gene-targeted mice. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 5, p. 1727–1737, 1998.

MENDEL, I.; DE ROSBO, N. K.; BEN-NUN, A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor V β expression of encephalitogenic T cells. **European**

Journal of Immunology, v. 25, n. 7, p. 1951–1959, 1995.

MENG, X. et al. Statins Induce the Accumulation of Regulatory T Cells in Atherosclerotic Plaque. **Molecular Medicine**, v. 18, p. 598–605, 2012.

MILLER, D. H. et al. A Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 1, p. 15–23, 2003.

MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 108–116, 2007.

ML-, N. E. W. B. Y. et al. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, p. 1346–1348, 1976.

MODY, N. et al. An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. **Biochemical Journal**, v. 575, p. 567–575, 2003.

MORGAN, I. M. Allergic Encephalomyelitis in Monkeys in Response To Injection of Normal Monkey Nervous Tissue. **The Journal of experimental medicine**, v. 85, n. 1, p. 131–140, 1947.

MORIKAWA, S. et al. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation and vascular constriction in HUVEC. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 9, p. 178–183, 2002.

MORIMOTO, H. et al. Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35449–35456, 2007.

MORRISON, L. R. Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. **Archives of Neurology And Psychiatry**, v. 58, n. 4, p. 391–416, 1947.

MUNOZ, J. J.; BERNARD, C. C. A.; MACKAY, I. R. Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. **Cellular Immunology**, v. 83, n. 1, p. 92–100, 1984.

MURTHY, S.; TONG, H.; HOHL, R. J. Regulation of Fatty Acid Synthesis by Farnesyl. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 51, p. 41793–41804, 2005.

NAKAMURA, K.; JOHNSON, G. L. PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 36989–36992, 2003.

NAMIKI, K. et al. Mechanism for p38 α -mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 29, p. 24228–24238, 2012.

NISHIMOTO, S.; NISHIDA, E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. **EMBO reports**, v. 7, n. 8, p. 782–786, 2006.

NITHIANANDARAJAH-JONES, G. N. et al. ERK5: Structure, regulation and function. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 11, p. 2187–2196, 2012.

NOACK, M.; MIOSSEC, P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 6, p. 668–677, 2014.

NOUBADE, R. et al. Activation of p38 MAPK in CD4 T cells controls IL-17 production and autoimmune encephalomyelitis. **Blood**, v. 118, n. 12, p. 3290–3300, 2011.

NURIEVA, R. et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 480–483, 2007.

OLITSKY, P. K.; TAL, C. Acute disseminated encephalomyelitis produced in mice by brain protelipide. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 79, p. 50–53, 1952.

OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715–725, 2000.

PABBISSETTY, S. K. et al. KLF2 is a rate-limiting transcription factor that can be targeted to enhance regulatory T-cell production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 26, p. 9579–9584, 2014.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 2005.

PATERSON, P. Y. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 111, n. 18, p. 119–136, 1960.

PATSY, B.M., RAY, W. FDA guidance on off-label promotion and the state of the literature from sponsors. **The Journal of the American Medical Association**, v. 299, n. 16, p. 1949–1951, 2008.

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829–839, 1998.

QIN, H. et al. TGF- β Promotes Th17 Cell Development through Inhibition of SOCS3. **The Journal of Immunology**, n. 23, p. 97–105, 2009.

RAINE, C. S.; PH, D.; SC, D. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 942–955, 2006.

RANSOHOFF, R. M.; HAFLER, D. A; LUCCHINETTI, C. F. Multiple sclerosis—a quiet revolution. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. March, p. 134–142, 2015.

RAVIV, Z.; KALIE, E.; SEGER, R. MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 9, p. 1773–1784, 2004.

REGAN, C. P. et al. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 14, p. 9248–9253, 2002.

RIVERS, T. M.; SCHWENTKER, F. F. Encephalomyelitis Accompanied By Myelin Destruction Experimentally Produced in Monkeys. **Journal of Experimental Medicine**, v. 61, n. 5, p. 689–702, 1935.

RIVERS, T. M.; SPRUNT, D. H.; BERY, G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **Journal of Experimental Medicine**, v. 58, p. 39–53, 1933.

ROBERTS, O. L. et al. ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 19, p. 3413, 2010.

ROBICHON, K. et al. Clozapine reduces infiltration into the CNS by targeting migration in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2020.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. Statins Increase the Frequency of Circulating CD4 + FOXP3 + Regulatory T Cells in Healthy Individuals. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. Atorvastatin Modulates Regulatory T Cells and Attenuates Cerebral Damage in a Model of Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 12, p. 152–162, 2017.

RONCHI, F. et al. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 β production by myeloid cells. **Nature Communications**, v. 7, n. May, 2016.

ROVIDA, E. et al. ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of

hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 1, p. 107–115, 2008.

SCHIFFENBAUER, J. et al. The induction of EAE is only partially dependent on TNF receptor signaling but requires the IL-1 type I receptor. **Clinical Immunology**, v. 95, n. 2, p. 117–123, 2000.

SCHRAML, B. U. et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T H 17 differentiation. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 405–409, 2009.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 636–645, 2009.

SOHN, S. J. et al. ERK5 MAPK Regulates Embryonic Angiogenesis and Acts as a Hypoxia-sensitive Repressor of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 43344–43351, 2002.

SOHN, S. J. et al. Transcriptional Regulation of Tissue-Specific Genes by the ERK5 Mitogen-Activated Protein Kinase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 19, p. 8553–8566, 2005.

SONG, J. et al. Inhibition of ROCK activity regulates the balance of Th1, Th17 and Treg cells in myasthenia gravis. **Clinical Immunology**, v. 203, n. May, p. 142–153, 2019.

SRIRAM, S. et al. This information is current as In vivo immunomodulation by monoclonal anti-CD4 antibody . II . Effect on T cell response to myelin basic protein and experimental allergic encephalomyelitis . Why The JI ? Submit online . • Rapid Reviews ! 30 days * from su. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 464–468, 1988.

STONE, S. H. Transfer of allergic encephalomyelitis by lymph node cells in inbred guinea pigs. **Science**, v. 134, p. 619–620, 1961.

STRITESKY, G. L.; YEH, N.; KAPLAN, M. H. IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 5948–5955, 2008.

STROMNES, I. M.; GOVERMAN, J. M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1810–1819, 2006.

SUTTON, C. et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1685–1691, 2006.

TAN, A. H.-M.; LAM, K.-P. Pharmacologic inhibition of MEK-ERK signaling enhances Th17 differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 4, p. 1849–57, 2010.

TANOUE, T. et al. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 110–116, 2000.

TEITELBAUM, D. et al. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. **Eur. J. Immunol.**, v. 1, p. 242–248, 1971.

TERASAWA, K.; OKAZAKI, K.; NISHIDA, E. Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. **Genes to Cells**, v. 8, p. 263–273, 2003.

TINTORE, M.; VIDAL-JORDANA, A.; SASTRE-GARRIGA, J. Treatment of multiple sclerosis — success from bench to bedside. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 1, p. 53–58, 2019.

TSIOUMPEKOU, M. et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of Erk5 MAP-kinase is dependent on Mek1/2, PKC and PI3-kinase, and affects BMP signaling. **Cellular Signalling**, v. 28, n. 9, p. 1422–1431, 2016.

TUMORIGENESIS, B. et al. ERK5 Knockdown Generates Mouse Leukemia Cells with Low MHC Class I Levels That Activate NK Cells and. **Journal of Immunology**, v. 5, n. 16, p. 3398–3405, 2009.

VELDHOEN, M. et al. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179–189, 2006.

VELDHOEN, M. et al. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 43–49, 2009.

VIGLIETTA, V. et al. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 7, p. 971–979, 2004a.

VIGLIETTA, V. et al. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 7, p. 971–979, 2004b.

VOLLMER, T. et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Lancet**, v. 363, n. 9421, p. 1607–1608, 2004.

WADA, T.; PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene**, v. 23, n. 16 REV. ISS. 2, p. 2838–2849, 2004.

WANG, W. et al. Genetic Activation of ERK5 MAP Kinase Enhances Adult Neurogenesis and Extends Hippocampus-Dependent Long-Term Memory. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 2130–2147, 2014.

WANG, X. et al. Targeted Deletion of mek5 Causes Early Embryonic Death and Defects in the Extracellular Signal-Regulated Kinase 5/Myocyte Enhancer Factor 2 Cell Survival Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 1, p. 336–345, 2005.

WANG, Y.; SU, B.; XIA, Z. Brain-derived Neurotrophic Factor Activates ERK5 in Cortical Neurons via a Rap1-MEKK2 Signaling Cascade. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 47, p. 35965–35974, 2006.

WANKE, F. et al. Expression of IL-17F is associated with non-pathogenic Th17 cells. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 8, p. 819–829, 2018.

WEI, L. et al. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 48, p. 34605–10, 2007.

WEI, W. et al. Blocking A 2B Adenosine Receptor Alleviates Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Inhibition of IL-6 Production and Th17 Differentiation . **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 138–146, 2013.

WEI, Z.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 2002.

YAN, C. et al. Molecular Cloning of Mouse ERK5/BMK1 Splice Variants and Characterization of ERK5 Functional Domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 10870–10878, 2001.

YANG, C. C. et al. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 20, p. 4771–4777, 1998.

YANG, J. et al. Mek3 is essential for early embryonic cardiovascular development. **Nature Genetics**, v. 24, n. 3, p. 309–313, 2000.

YANG, Q. et al. Article Pharmacological Inhibition of BMK1 Suppresses Tumor Growth through Promyelocytic Leukemia Protein. **Cancer Cell**, v. 18, n. 3, p. 258–267, 2010.

YANG, X. O. et al. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9358–9363, 2007.

YANG, X. O. et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR a and ROR g. **Immunity**, v. 28, p. 29–39, 2008.

YASUI, Y. et al. A lipophilic statin , pitavastatin , suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis. **Internacional Journal of Cancer**, v. 121, p. 2331–2339, 2007.

YEDNOCK, T. et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 63–66, 1992.

YONG, T.; MEININGER, G. A.; SCOTT LINTHICUM, D. Enhancement of histamine-induced vascular leakage by pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 45, n. 1–2, p. 47–52, 1993.

ZHANG, X. et al. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORc in CD4+ lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 6988–6996, 2008.

ZHOU, G.; BAO, Z. Q.; DIXON, J. E. Components of a New Human Protein Kinase Signal Transduction Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 12665–12669, 1995.

ZHOU, L. et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 967–974, 2007.

ZHOU, L. et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. **Nature**, v. 453, n. 7192, p. 236–40, 2008.

ZHOU, W. et al. Inhibition of Rho-Kinase Downregulates Th17 Cells and Ameliorates Hepatic Fibrosis by Schistosoma japonicum Infection. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1262, 2019.

ZHU, J.; GAO, B. Simvastatin combined with aspirin increases the survival time of heart allograft by activating CD4 + CD25 + Treg cells and enhancing vascular endothelial cell protection. **Cardiovascular Pathology**, v. 24, n. 3, p. 173–178, 2015.

ZORN, E. et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1571–1579, 2006.

Legends

Fig. 1. Pitavastatin reduces EAE severity in a dose-dependent manner. C57BL/6 mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ in CFA. One day before immunization, the mice were treated with pitavastatina (1, 3 or 10 mg/kg, orally, daily) until the end of the experiment. **a.** Clinical symptoms of EAE evaluated daily. **b.** Development of EAE represented in linear-regression curves. **c.** The EAE incidence of vehicle and pitavastatin (10 mg/kg) evaluated daily and classified by disease activity, as no disease (score 0), mild EAE (0.5-2.0) or severe (2.5-3.5). **d,** **e.** Leukocyte infiltration and myelin damage determined by Histological analyzes (Hematoxilin-Eosin and Fluoromyelin, respectively) of the spinal cords from naïve, vehicle group or pitavastatina, which were collected at day 25 post-immunization. Data are mean $\pm$ S.E.M., n = 5. Data are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 2. Pitavastatin treatment attenuates CNS inflammation. EAE was induced with MOG₃₅₋₅₅ injection in CFA plus treatment with pertussis toxin. **a.** Gene expression of *Ccr2*, *Cx3cr1*, *Iba1* (*Aif1*) and *Gfap* in the spinal cord from EAE-bearing mice measured by qPCR. Naïve group was used as calibrator of the fold change. **b.** IBA1 expression determined by western blot. GAPDH used as load control. Data are mean $\pm$ S.E.M, n = 5. * $p < 0.05$. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 3. Th17 response is reduced after pitavastatin treatment. C57BL/6 mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅. **a.** Gene expression of cytokines produced by Th17 cells (*Il17a*, *Csf2* and *Il21*). Naïve group was used as calibrator of the fold change. **b.** Th17 response confirmed by expression of pSTAT3, a transcription factor of these cells. The STAT3

phosphorylation was investigated in two different sites (Y705 and Ser727). Data are mean $\pm$ S.E.M, n = 5. * $p < 0.05$. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 4. Pitavastatin controls Treg and Th17 differentiation *in vivo*. EAE was induced with MOG₃₅₋₅₅ injection in CFA plus treatment with pertussis toxin and on day 5 dLNs were harvested for analysis. **a.** IL-17 and IFN γ production by CD4 T cells determined by intracellular flow cytometry **b.** Frequency of CD4⁺FoxP3⁺ cells. **c.** IL-17 production and Ror γ t expression investigated by intracellular flow cytometry in lymph node cells restimulated with MOG₃₅₋₅₅ and Th17 cytokines cocktail (TGF- β +IL-6+IL-1 β +IL-23). Data are mean $\pm$ S.E.M, n = 5. * $p < 0.05$. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 5. Pitavastatin controls Treg and Th17 differentiation *in vitro*. CD4⁺CD25⁻CD44^{low} were isolated from spleen and lymph nodes from naïve mice and cultured under Treg and Th17 conditions. **a,b.** FoxP3 and IL-17 expression in CD4 T cells investigated by intracellular flow cytometry at 96 h of culture with or without pitavastatin (0.1, 0.3 or 1 μ M). Data are mean $\pm$ S.E.M, n = 3. * $p < 0.05$. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 6 Pitavastatin effects are dependent of the mevalonate synthesis. CD4⁺CD25⁻CD44^{low} were isolated from spleen and lymph nodes from naïve mice and cultured under Treg and Th17 conditions. **a,b.** FoxP3 and IL-17 expression in CD4 T cells investigated by intracellular flow cytometry at 96 h of culture with or without pitavastatin (0.1, 0.3 or 1 μ M) or Mevalonate (1mM). Data are mean $\pm$ S.E.M, n = 3. * $p < 0.05$. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. sup. 1. Pitavastatin reduces cytokines production in an antigen-specific response. EAE was induced with MOG₃₅₋₅₅ injection in CFA plus treatment with pertussis toxin and on day 5

dLNs were harvested and reestimated *in vitro* with MOG₃₅₋₅₅ or MOG₃₅₋₅₅ and Th17 cytokines cocktail (TGF- β +IL-6+IL-1 β +IL-23) and the cytokines were measured by ELISA. **a.** IL-17 production **b.** GM-CSF production. Data are mean $\pm$ S.E.M, n = 5. * p < 0.05. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. sup. 2. Pitavastatin controls IL-17 and GM-CSF production by Th17 cells.

CD4⁺CD25⁻CD44^{low} were isolated from spleen and lymph nodes from naïve mice and cultured under Th17 conditions with or without pitavastatin (1 μ M). The cytokines production was measured in the supernatant from the culture **a,b.** IL-17 and GM-CSF production. Data are mean $\pm$ S.E.M, n = 3. * p < 0.05. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. sup. 3. Mevalonate blocks pitavastatin effects on IL-17 and GM-CSF production.

CD4⁺CD25⁻CD44^{low} were isolated from spleen and lymph nodes from naïve mice and cultured under Th17 conditions with or without pitavastatin (1 μ M) and mevalonate (1 mM). The cytokines production was measured in the supernatant from the culture **a,b.** IL-17 and GM-CSF production. Data are mean $\pm$ S.E.M, n = 3. * p < 0.05. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure Supplementary 1

Figure Supplementary 2

Figure Supplementary 3