



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



Efeito profilático da associação de MOG com Vitamina D na encefalomielite autoimune experimental

LUIZA AYUMI NISHIYAMA MIMURA

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

Orientadora: Alexandrina Sartori

**BOTUCATU – SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeito profilático da associação de MOG com Vitamina D na
encefalomielite autoimune experimental

LUIZA AYUMI NISHIYAMA MIMURA

ALEXANDRINA SARTORI

FERNANDA CHIUSO MINICUCCI

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

Orientadora: Alexandrina Sartori

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mimura, Luiza Ayumi Nishiyama.

Efeito profilático da associação de MOG com vitamina D na encefalomyelite autoimune experimental / Luiza Ayumi Nishiyama Mimura. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Alexandrina Sartori

Coorientador: Fernanda Chiuso Minicucci

Capes: 21104000

1. Glicoproteínas. 2. Vitamina D. 3. Esclerose múltipla. 4. Doenças autoimunes.

Palavras-chave: Adjuvante tolerogênico; Encefalomyelite autoimune experimental; Esclerose múltipla; Glicoproteína da mielina do oligodendrócito ; Vitamina D3.

Não sei quantas almas tenho

*Não sei quantas almas tenho.
Cada momento mudei.
Continuamente me estranho.
Nunca me vi nem acabei.
De tanto ser, só tenho alma.
Quem tem alma não tem calma.
Quem vê é só o que vê,
Quem sente não é quem é,*

*Atento ao que sou e vejo,
Torno-me eles e não eu.
Cada meu sonho ou desejo
É do que nasce e não meu.
Sou minha própria paisagem;
Assisto à minha passagem,
Diverso, móbil e só,
Não sei sentir-me onde estou.*

*Por isso, alheio, vou lendo
Como páginas, meu ser.
O que segue não prevendo,
O que passou a esquecer.
Noto à margem do que li
O que julguei que senti.
Releio e digo: "Fui eu?"
Deus sabe, porque o escreveu.*

Fernando Pessoa

*Dedico este trabalho, especialmente,
a minha família
(Ka, To, Bah, Díh e Mah),
pelo apoio incondicional para tornar possível
a realização dos meus sonhos e pela formação
do meu caráter.*

Agradeço,

A Alexandrina Sartori, minha orientadora.

*Pela confiança, orientação, entusiasmo e que com muita
dedicação tornou possível este trabalho.*

*É imensurável a sua contribuição para meu amadurecimento
profissional e pessoal.*

Ao Marcos, meu amigo, amor e cúmplice de aventuras.

Obrigada pelo apoio, paciência e companheirismo.

“...todos os caminhos

Me encaminham pra você”

A Fernanda, Thaís Donegá, Larissa Lumí, Sofia e Thaís Fraga.

*Minhas companheiras de laboratório, que me deram um
suporte imensurável para a realização deste trabalho e por
tornar o dia a dia mais leve.*

As minhas amigas-irmãs e seus respectivos, Carol, Priscila,

*Luísa, Isabela, Dú e Ícaro. Grandes amigos que me
acompanham desde a graduação. Muito obrigada pelo apoio
nos momentos difíceis e por compartilhar tantas alegrias.*

Ao Laboratório de Imunopatologia Experimental (LIPE),

*onde realizei minha iniciação científica. Todos que
passaram por este estágio da minha carreira serão lembrados
com muito carinho e serei eternamente grata.*

Ao Dr. Robson Francisco Carvalho e à Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares pela contribuição durante o meu exame de Qualificação.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu pelo suporte técnico.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Dr. Amaral Carvalho em Jaú, por realizar as análises de citometria de fluxo.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	09
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Esclerose múltipla (EM).....	11
Encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	13
Estratégias imunoproláticas nas doenças autoimunes.....	15
Estratégias imunoproláticas na EAE.....	16
Efeito imunomodulador da vitamina D.....	17
Racional científico.....	20
Objetivos.....	20
Materiais & Métodos.....	21
Protocolos & Resultados.....	26
Discussão.....	49
Referências bibliográficas.....	55
Manuscrito submetido.....	65

Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória, crônica e desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC). A caracterização de estratégias profiláticas ou terapêuticas na EM é necessária já que não há cura para a doença. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial profilático da associação de MOG (glicoproteína da mielina do oligodendrócito) com vitamina D3 (VitD) na encefalomielite autoimune experimental (EAE). Para isto, camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG na presença de VitD e posteriormente submetidos à indução da EAE. Os animais foram então eutanasiados nos dias 7 e 19 após indução da EAE os quais correspondem às fases pré-clínica e clínica da doença, respectivamente. Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso corporal, escore clínico, processo inflamatório no SNC, quantidade de células dendríticas (DCs) e de T reguladoras (Tregs) no baço e produção de citocinas por células esplênicas e células mononucleares eluídas do SNC. A imunização com MOG associada com VitD impediu o desenvolvimento da EAE. O efeito profilático observado reduziu a maturação das DCs e a produção de citocinas encefalitogênicas, mas não aumentou a quantidade de Tregs no baço. Já no SNC a imunização determinou redução acentuada no processo inflamatório e na produção de citocinas encefalitogênicas. Os dados obtidos indicam que a associação do antígeno específico (MOG) com VitD foi suficientemente tolerogênica para evitar o desenvolvimento da EAE. Efeito similar em outras patologias autoimunes é esperado e merece investigação.

Abstract

Multiple sclerosis is a chronic, inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). As there is no cure for this disease, new prophylactic or therapeutic strategies are necessary. The main objective of this work was to evaluate the prophylactic potential of the association of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) with vitamin D3 in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). C57BL/6 mice were immunized with MOG associated with vitamin D3 and then submitted to EAE induction. Animals were euthanized 7 and 19 days after, during the preclinical and acute disease phases, respectively. The following parameters were evaluated: body weight, clinical score, inflammatory process in the CNS, amount of dendritic and regulatory T cells in the spleen and cytokine production by spleen and CNS cell cultures. Immunization with MOG associated with vitamin D3 blocked clinical EAE development. This prophylactic effect was associated with a drastic reduction in clinical score, body weight loss, CNS inflammation, dendritic cells maturation and also in the production of cytokines by CNS and spleen cell cultures. This association was therefore highly tolerogenic, being able to avoid EAE development. A similar effect from vitamin D3 association with other specific self-antigens is expected in other autoimmune conditions and deserves future evaluation.

Introdução

Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) (Hohlfeld, 2009). Segundo a *World Health Organization* (2008) a doença afeta mais de dois milhões de pessoas no mundo sendo a prevalência estimada em torno de 30 casos para 100.000 pessoas. O diagnóstico é basicamente definido por imagens de ressonância magnética, análise do fluido cefalorraquidiano e presença de sintomas tais como tremores, fraqueza, disfunção urinária e dor (Polman et al., 2005; Compston & Coles, 2008). A maioria dos pacientes apresenta, inicialmente, um quadro transitório de sintomas com períodos de exacerbação e remissão da doença, seguido por fase secundária progressiva, caracterizada por perdas irreversíveis e neurodegeneração (Hohlfeld, 2009).

A etiologia e a imunopatogênese da doença ainda não são completamente elucidadas. Acredita-se que fatores ambientais e predisposição genética estão envolvidos no início e desenvolvimento da EM (Lin et al., 2012; Kremensow et al., 2013). Um dos fatores ambientais possivelmente envolvidos na quebra da autotolerância é o contato com patógenos que poderiam induzir autoimunidade através de mimetismo antigênico que ocorre quando células T específicas para peptídeos derivados de patógenos possuem reatividade cruzada com auto-antígenos (Chastain & Miller, 2012). Em relação à predisposição genética, um forte candidato é o alelo HLA-DRB1*1501 que tem uma frequência de 14 a 30% em populações de países com alto risco de EM (Schmidt et al., 2007).

Classicamente a EM foi descrita como uma doença autoimune mediada por células Th1 com especificidade para antígenos do SNC (Sospedra & Martin, 2005). Entretanto, publicações mais recentes demonstram que células T CD4+ produtoras de IL-17 (Th17) também desempenham um papel importante no processo inflamatório que ocorre no SNC dos pacientes com EM (Aranami & Yamamura, 2008; Wojkowska et al., 2014). Foi demonstrada, por exemplo, a presença de células Th17 no tecido cerebral (parte lesionada) de pacientes com EM (Tzartos et al., 2008). Além disso, foram encontradas concentrações significativamente mais elevadas de IL-17 no fluido

cefalorraquidiano de pacientes com EM em comparação com indivíduos saudáveis (Ishizu et al., 2005). Assim, as citocinas produzidas por células Th1 e Th17, como IFN- γ , TNF- α e IL-17 parecem mediar o processo inflamatório no SNC e consequente degeneração axonal, morte dos oligodendrócitos e disfunção neuronal (Lucchinetti et al., 2000; Sospedra & Martin, 2005; Furuzawa-Carballeda et al., 2007). As principais características histopatológicas da EM incluem presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos T e B e macrófagos, desmielinização, ocasionada pela destruição da bainha de mielina ou pela morte dos oligodendrócitos, dano ou perda dos axônios, gliose, que se caracteriza por aumento do número de células da glia na substância branca (Constantinescu et al., 2011). A imunopatogênese da EM também tem sido atribuída a defeitos na atividade funcional de células T reguladoras (CD4+CD25+). Essas células são importantes não apenas para a manutenção da tolerância periférica, mas também para controlar a autoimunidade órgão-específica através da supressão de células T autorreativas (Sakaguchi et al., 1995; Tang et al., 2004). Em alguns trabalhos são descritos níveis normais dessas células em pacientes com EM (Viglietta et al., 2004; Haas et al., 2005; Venken et al., 2006) enquanto em outros é relatada diminuição destas células (Praksova et al., 2012; Huan et al., 2005). Também tem sido constatada redução na atividade funcional destas células reguladoras *in vitro* (Haas et al., 2005; Huan et al., 2005).

Devido às lacunas ainda presentes em relação à etiologia e à patogênese da doença, os tratamentos para a EM são baseados em drogas imunomoduladoras genéricas que visam reduzir a gravidade e a frequência das recidivas. Apesar de ainda se discutir o balanço entre o benefício e o risco, o IFN- β e o acetato de glatiramer são frequentemente utilizados no tratamento desta patologia (Filippini et al., 2013). O mecanismo de ação do IFN- β inclui efeitos variados sobre as células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T e B como, por exemplo, redução da apresentação de antígenos, da produção de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de MHC-II, determinando um ambiente anti-inflamatório (Kasper & Reder, 2014). Entre outros efeitos, o acetato de glatiramer induz células T reguladoras e diminui a diferenciação de Th1 e Th17. Além disto, esta droga é neuroprotetora e determina reparos no SNC (Aharoni, 2014). As terapias disponíveis não curam a EM; além disto, causam efeitos colaterais graves como o aumento de suscetibilidade aos agentes infecciosos. Neste

contexto, existe um consenso de que as estratégias imunomoduladoras baseadas na indução de tolerância específica para neuroantígenos são ideais.

Encefalomielite autoimune experimental

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é um modelo amplamente aceito para elucidar os mecanismos da doença e alternativas de tratamentos imunomoduladores. Para mimetizar o perfil da doença, camundongos ou ratos são imunizados com antígenos específicos derivados de mielina, como por exemplo, a proteína básica da mielina (MBP), glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG) ou peptídeos derivados destas proteínas associados ao Adjuvante Completo de Freund (ACF). A doença murina desencadeada em diferentes cepas de camundongos isogênicos mimetiza melhor o decurso crônico e/ou de exacerbação-remissão que é o mais comum na EM (Gold et al., 2006; Croxford et al., 2011). Por exemplo, a imunização de camundongos C57BL/6 com um peptídeo (35-55) derivado de MOG desencadeia uma doença neurológica caracterizada por paralisia e também um extenso processo de desmielinização. Os animais desenvolvem doença crônica após a imunização que perdura por, pelo menos, 45 dias (Bernard et al., 1997).

A EAE tem sido classicamente considerada uma doença mediada por células Th1 específicas para mielina que migram da periferia para o SNC. Esta contribuição tem sido confirmada, pois células Th1 específicas para mielina transferem adotivamente a doença e também tem sido demonstrado que citocinas pró-inflamatórias produzidas por estas células, tais como IFN- γ e TNF- α danificam a bainha de mielina (Klinkert et al., 1997; Sun et al., 2004). De maneira similar ao que é observado na EM, as células Th17 desempenham um papel crítico na patogênese da EAE. Por exemplo, animais deficientes em IL-17 desenvolvem EAE mais tardiamente e com sintomatologia mais branda (Komiya et al., 2006). A observação de que células Th17 específicas para mielina podem determinar o desenvolvimento de EAE após transferência adotiva destas células comprovam o papel da Th17 na EAE (Awasthi et al., 2008). Além disto, esta citocina participa da ruptura da barreira hematoencefálica, o que é considerado um evento essencial para o início da inflamação local. A IL-17 também auxilia a migração de células inflamatórias para o SNC e estimula a produção de espécies reativas de

oxigênio (ROS) acarretando redução da expressão de moléculas de junção das células endoteliais (Huppert et al., 2010). Um esquema ilustrativo da imunopatogênese da EAE proposto por *Fletcher et al.*(2010) é mostrado na figura 1.

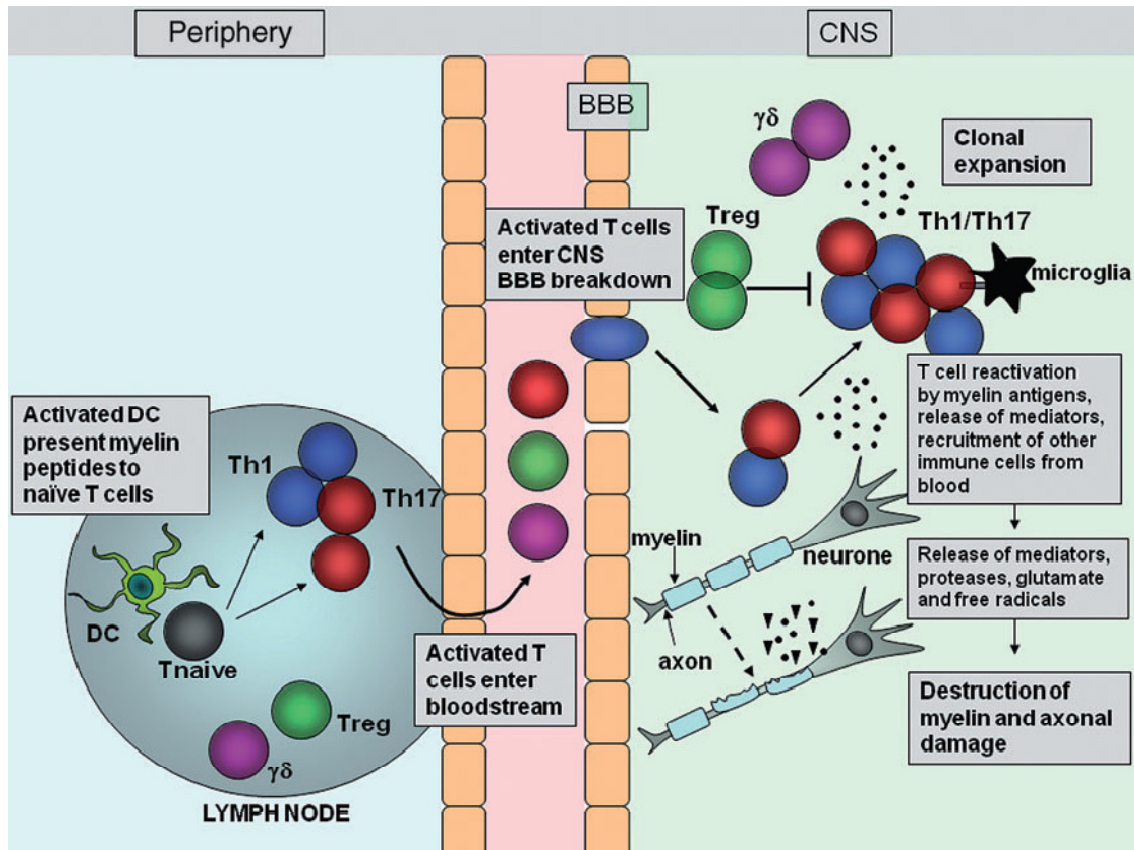


Figura 01. Migração e funções de células T efectoras no SNC durante a EAE. As células T ativadas específicas para mielina entram na corrente sanguínea e migram para o SNC. Após a quebra da barreira hematoencefálica as células T expandem e mediadores inflamatórios recrutam outras células do sistema imunológico para o sítio da inflamação. A ativação de células da microglia resulta na produção de mediadores citotóxicos que promovem a degradação da mielina. Os danos no revestimento de mielina são seguidos por lesão axonal e neurológica (Fletcher et al., 2010).

Estratégias imunomoduladoras como, por exemplo, a indução de tolerância antígeno-específica e a indução/ativação de células T reguladoras, estão sendo cada vez mais testadas como alternativa para as terapias baseadas na imunossupressão global da resposta imune. Em modelos experimentais a autotolerância pode ser induzida por diferentes estratégias tais como administração do autoantígeno por via tolerogênica (mucosa ou oral, por exemplo), bloqueio concomitante de moléculas co-estimulatórias ou direcionamento do autoantígeno para células apresentadoras de antígenos (APCs) em repouso. Dentro deste contexto, destacam-se os estudos que visam definir as condições ideais para a indução de células dendríticas (DCs) tolerogênicas (van Brussel et al., 2014). Apesar de caracterizadas tradicionalmente como fortes indutoras de resposta imune, tem sido demonstrado em modelos experimentais que estas APCs atuam não só na indução da resposta imune como também na manutenção da tolerância aos autoantígenos. Por exemplo, DCs produtoras de IL-4 podem prevenir ou mesmo reverter artrite e diabetes em modelos murinos (Thomson & Robbins, 2008).

Diversos trabalhos destacam o papel de DCs tolerogênicas em doenças autoimunes, sendo o microambiente um fator importante para sua diferenciação (Torres-Aguilar et al., 2010). Neste sentido, destacam-se a presença de citocinas supressoras tais como IL-10 e TGF- β e outros fatores como fator de crescimento de hepatócitos, GM-CSF, prostaglandina E2 e histamina (Taub, 2004; Kalinski et al., 1998). Agentes farmacológicos incluindo corticosteróides, ciclosporina A, rapamicina, micofenolatomofetil, prostaglandina E2 e vitamina D3 (VitD), conferem propriedades tolerogênicas às DCs (Hackstein & Thomson, 2004; Adorini et al., 2004). A promoção/manutenção de tolerância por DCs tem sido atribuída a diferentes mecanismos imunológicos: indução de anergia ou apoptose de células T virgens ou de memória (Süss & Shortman, 1996), ativação seletiva de células Th2 (Khoury et al., 1996) e indução de células T reguladoras (Menges et al., 2002).

Apesar dos resultados promissores *in vitro*, poucos trabalhos abordam o potencial destes agentes farmacológicos de induzir DCs tolerogênicas *in vivo*. Este aspecto está diretamente relacionado à investigação que realizamos. O primeiro estudo neste sentido foi realizado por Kang et al. (2008). Estes autores mostraram que a

dexametasona, uma droga imunossupressora do grupo dos glicocorticóides, pode funcionar como um adjuvante tolerogênico quando administrada juntamente com um peptídeo imunogênico. Camundongos BALB/c previamente imunizados com OVA e capazes de montar uma reação de hipersensibilidade tardia a este antígeno foram dessensibilizados através de um protocolo de imunização com este mesmo antígeno administrado na presença de dexametasona. Um dos achados mais interessantes, e no qual se baseia parcialmente o trabalho que realizamos, é que este protocolo causou uma dessensibilização duradoura cujo mecanismo envolveu um bloqueio na maturação de DCs associado a uma expansão de células T CD4+CD25+Foxp3+ antígeno-específicas. Esta estratégia também impediu o desenvolvimento do diabetes. Estes autores mostraram que camundongos NOD imunizados com um peptídeo derivado da insulina (Ag B: 9-23) na presença de dexametasona, permaneceram livres da doença durante todo o período de observação (35 semanas).

Estratégias imunoproláticas na EAE

Diferentes estratégias imunoproláticas visando o controle da EM vêm sendo inicialmente testadas no modelo EAE. Por exemplo, em um trabalho realizado por nosso grupo, demonstramos que a imunização com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) seguida de um reforço com a vacina de DNA contendo o gene que codifica a hsp65 (proteína de choque térmico com propriedade reguladora do sistema imune) de *M. leprae* (pVAXhsp65), promoveu proteção contra a EAE em camundongos C57BL/6 (Zorzella-Pezavento et al., 2013). Resultados interessantes também foram observados quando diferentes drogas foram associadas ao antígeno específico MOG. Kang et al., (2009) mostraram que a imunização de camundongos C57BL/6 com MOG, administrada sob a forma de vacina gênica e associada ao tacrolimus (droga imunossupressora utilizada no tratamento de doenças autoimunes e alérgicas e também na prevenção da rejeição do transplante) impediu o desenvolvimento da EAE. Esta proteção foi associada com menor infiltrado celular e predomínio de T reguladoras no cérebro. Em um trabalho mais recente, camundongos pré-imunizados com MOG associada ao Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) não desenvolverem escore clínico.

Esta proteção foi associada com redução na expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e de MHCII em esplenócitos CD4- e CD8- (Zheng et al., 2014).

Efeito imunomodulador da vitamina D3

O hormônio $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, também denominado calcitriol, é a forma ativa da vitamina D3 (VitD) e seus efeitos biológicos são mediados pelo receptor para vitamina D (VDR) que é um membro da superfamília de receptores nucleares para hormônios. O VDR é encontrado em muitos tipos celulares incluindo células do sistema imunológico e células do SNC. Este receptor funciona como um fator de transcrição que se liga a determinadas sequências do DNA (Calberg & Polly, 1998; Eyles et al., 2005).

Na imunidade inata, o calcitriol diminuiu a produção da citocina pró-inflamatória $\text{TNF-}\alpha$ quando adicionado em monócitos humanos. Este efeito foi mediado por interação com receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) (Du et al., 2009). Estudos *in vitro* também indicam que esta vitamina inibe a proliferação de células T e também a produção de IL-2 e $\text{IFN-}\gamma$ (Dimeloe et al., 2010). Seu efeito sobre células Th2 é menos claro, sendo que alguns relatos indicam polarização desta resposta e aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (Boonstra et al., 2001; Sloka et al., 2011), enquanto outros mostram redução no número de células produtoras de IL-4 ou até mesmo ausência deste efeito (Dimeloe et al., 2010). A dependência das concentrações utilizadas *in vitro* tem sido apontada como causa destes resultados contraditórios. Este efeito inibidor de Th1 e esta variabilidade sobre a Th2 também têm sido constatados em modelos murinos de doenças autoimunes (Mattner et al., 2000; Overbergh et al., 2000).

Apesar destas discrepâncias, a complexidade do efeito da VitD sobre as células T vem sendo, aos poucos, esclarecida. Sabe-se, por exemplo, que o efeito inibidor sobre a proliferação pode ocorrer tanto sobre as células T virgens quanto sobre células T já diferenciadas e comprometidas (Piemonti et al., 2000; van Halteren et al., 2002). Parte da atividade imunorreguladora do calcitriol tem sido atribuída aos seus efeitos sobre DCs e consequente indução de células Tregs. DCs humanas diferenciadas na presença de calcitriol são imaturas e se caracterizam por expressão reduzida de CD1a, MHC II, CD40, CD80 e CD86 (Adorini & Penna, 2009). Estas células também produzem menor quantidade de IL-12 e maior concentração de IL-10. Estes efeitos determinam uma

condição tolerogênica na qual estas DCs se tornam incapazes de estimular a proliferação de células T. Este fenômeno tem sido, pelo menos em parte, atribuído à geração de células T com atividade supressora (Tregs), pois a co-cultura de DC pré-tratada com calcitriol e células T CD4+ CD25+ leva à indução de células Treg CD4+ Foxp3+ (Penna et al., 2005). Outra subpopulação afetada pela vitamina D é a Th17. A administração de calcitriol teve um efeito inibidor sobre a resposta Th17 tanto na colite quanto na uveíte (Tang et al., 2009). Um esquema dos efeitos da VitD sobre a imunidade inata e adaptativa proposto por Mathieu C. (2011) é ilustrado na figura 02.

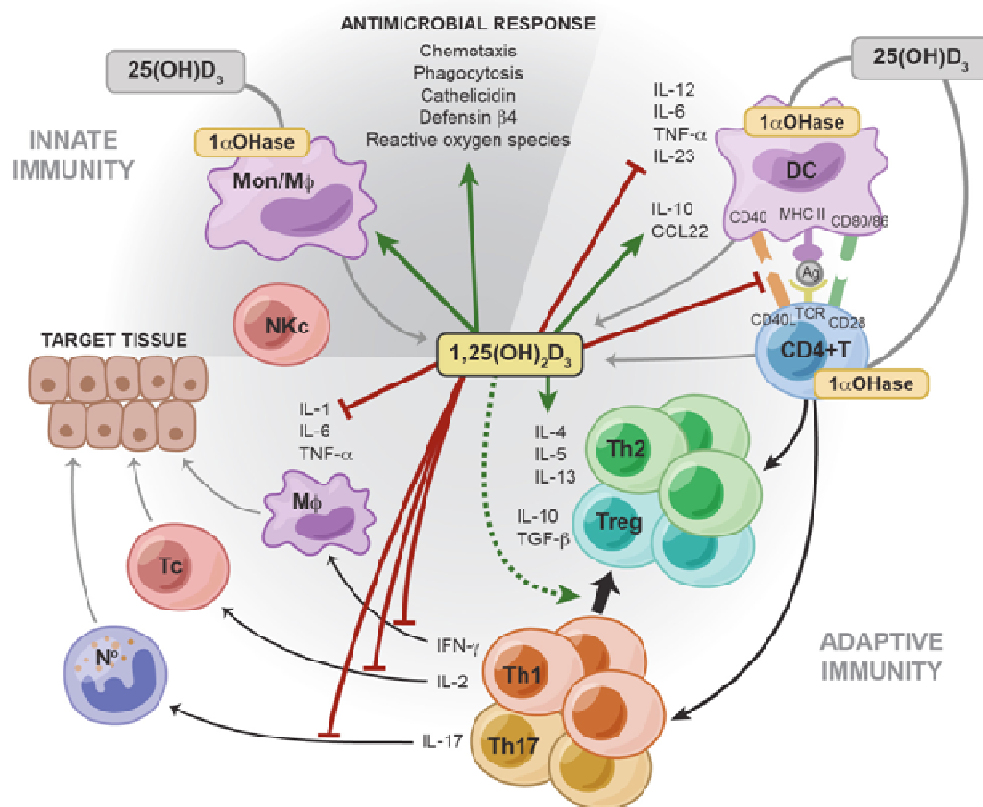


Figura 02. Efeito imunomodulador da VitD. Na resposta imune inata a VitD aumenta a atividade fagocítica dos macrófagos e a produção de proteínas antimicrobianas. Na resposta imune adaptativa a VitD atua, direta ou indiretamente, sobre diferentes tipos celulares como DCs, Th1, Th2, Th17, Tregs e células B determinando, em geral, inibição da apresentação antigênica e da diferenciação destas subpopulações celulares (Mathieu C, 2011).

Várias publicações ilustram o papel imunomodulador benéfico da VitD em modelos experimentais de doenças autoimunes. O tratamento de camundongos NOD adultos com um análogo do calcitriol inibiu a produção de IL-12 e IFN- γ , impediu a infiltração de células Th1 no pâncreas e bloqueou a progressão da insulite. Este bloqueio na evolução da insulite foi acompanhado de maior frequência de Tregs CD4⁺ e CD25⁺ no pâncreas e nos linfonodos os quais foram capazes de retardar significativamente a doença desencadeada por transferência adotiva (Gregori et al., 2002). Na EAE foi demonstrado que a administração de VitD ou a transferência adotiva de DCs imaturas induzidas pela VitD, são capazes de aumentar a população de Tregs diminuindo a gravidade da EAE (Farias et al., 2013). No modelo de uveíte autoimune experimental foi constatado que o calcitriol suprime a autoimunidade através da inibição da resposta de células Th17, interferindo na capacidade de ativação, diferenciação e produção de citocinas por estas células (Tang et al., 2009).

Racional científico do projeto

No contexto descrito acima, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o potencial profilático da associação de MOG com a VitD na EAE. Neste caso, a indução de tolerância específica está baseada no uso da VitD como adjuvante tolerogênico. O diferencial de nossa proposta está no emprego desta droga *in vivo*, pois a grande maioria dos protocolos é realizada *in vitro*. Espera-se que o processo de imunização com o antígeno na presença deste fármaco polarize a resposta imune no sentido da tolerância. Esta previsão é baseada em dados já publicados na literatura que indicam que esta droga é capaz de impedir o processo de maturação de DCs, mantendo-as, portanto, em um estado tolerogênico. Estas DCs imaturas desencadeariam tolerância através de vários mecanismos, sendo um deles relacionado com células Tregs (conversão de T *naive* em T reguladora, ativação e/ou expansão destas células).

Objetivo geral

Avaliar o potencial profilático da associação de MOG com VitD na EAE.

Objetivos específicos

- 1- Avaliar o potencial imunomodulador da associação MOG + VitD *in vivo*;
- 2- Avaliar o efeito profilático da associação MOG+VitD nas características clínicas, histopatológicas e imunológicas da EAE;
- 3- Se ocorrer proteção, avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos.

Materiais & Métodos

Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (fêmeas) com 7-9 semanas de idade, provenientes da Universidade de São Paulo (USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os animais receberam ração autoclavada e água filtrada *ad libitum*. Os experimentos foram realizados segundo os regulamentos da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu (protocolo 571).

Imunização com MOG+vitamina D

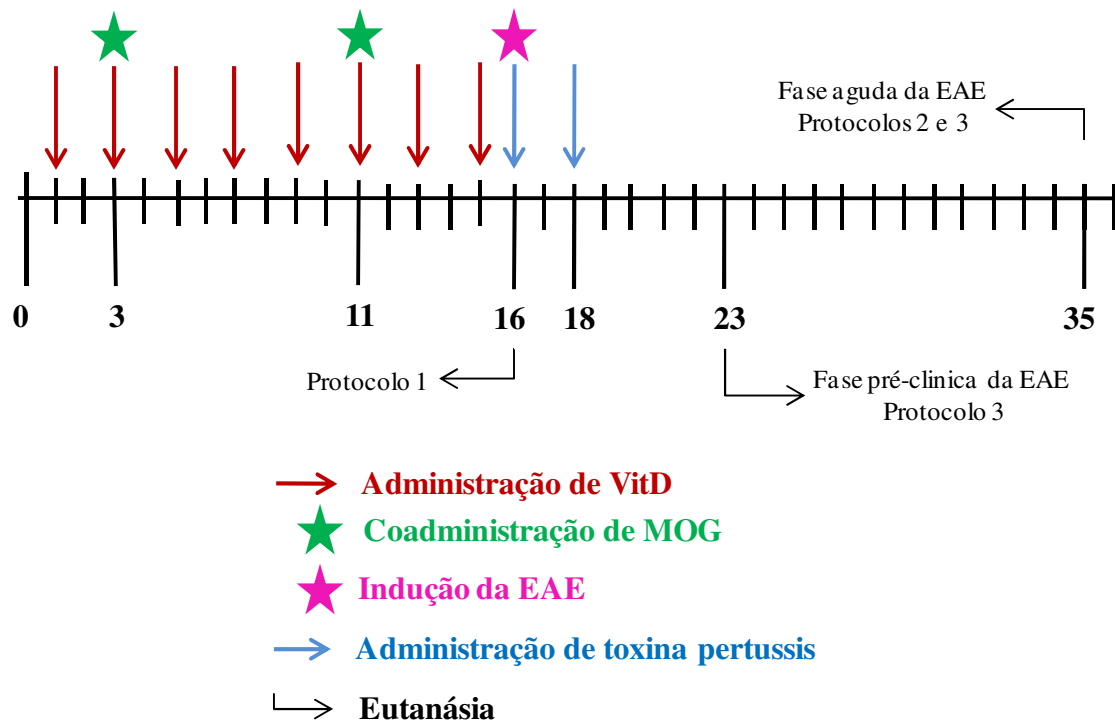
Os camundongos foram injetados por via intraperitoneal com 0,1µg de VitD (1α, 25-dihydroxyvitaminD3 – Sigma) em dias alternados durante 15 dias, conforme descrito por *Lemire & Archer* (1991). A co-administração de 150 µg de MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein - Genemed) foi realizada no 3º e no 11º dia do tratamento. Nos experimentos iniciais também foram analisados grupos controle injetados apenas com VitD ou MOG.

Indução de EAE e avaliação clínica

Um dia após a finalização do processo profilático com MOG+VitD, os animais foram injetados, por via subcutânea no dorso, com 150 µg de MOG em 50 µl de Adjuvante Completo de Freund (ACF) (Sigma) contendo *Mycobacterium tuberculosis* (4 mg/mL). No dia da indução e 48 horas depois, os animais foram inoculados com 250 ng de toxina pertussis via intraperitoneal. O peso e os sinais clínicos da doença foram avaliados diariamente. A gravidade da doença foi definida segundo a seguinte escala: 0- normal; 1- cauda frouxa; 2- paraparesia moderada, perda da tonicidade do movimento; 3- paralisia parcial dos membros posteriores; 4- paraplegia; 5- tetraplegia ou morte.

Delineamento experimental

O procedimento experimental está delineado no esquema baixo. São indicados os períodos de administração de VitD, co-administração de MOG, o processo de indução da EAE (incluindo a administração de toxina petussis) e os três períodos da realização da eutanásia.



Dosagem de cálcio sérico

As dosagens de cálcio foram realizadas em amostras de soro obtidas no dia seguinte à finalização do processo profilático. As dosagens foram feitas com o kit comercial Cálcio Arsenazo III (Bioclin) pela metodologia Colorimétrica de Ponto Final - Arsenazo III, no laboratório veterinário VidaVet, Botucatu, SP.

Obtenção de células do SNC

Para obtenção das células mononucleares do SNC, os animais foram inicialmente anestesiados com xilazina e ketamina e perfundidos com salina estéril.

Cérebros e medulas espinhais (porção cervical, torácia e lombar) foram retirados, cortados com tesoura e incubados em placas de Petri contendo 2,5mg/mL de collagenase D (Roche) em 4mLs de meio RPMI (complementado com gentamicina, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de soro bovino fetal (SBF) e 2% de L-glutamina) durante 45 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Após este período as amostras foram processadas em *cell strainers* e transferidas para tubos contendo meio RPMI. Os tubos foram centrifugados a 450xg por 15 minutos a 4°C e os *pellets* foram então ressuspensos em 6 mLs de Percoll (Sigma) a 37%. Esta suspensão foi adicionada lentamente sobre Percoll 70% em tubos de 15 mLs e centrifugados a 950xg por 20 minutos a 4°C em centrífuga com o freio desativado. Ao final da centrifugação a fase superior contendo grande concentração de mielina foi coletada por sucção e desprezada. O anel contendo células mononucleares foi coletado e transferido para tubos de 15 mLs aos quais se adicionou RPMI gelado. As células foram então centrifugadas a 450g a 4°C por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em RPMI completo e as células foram contadas e ajustadas para 2×10^5 células/mL.

Obtenção de células esplênicas e de linfonodos (poplíteos e inguinais)

Baço e linfonodos foram retirados, desagregados em *cell strainers* e as células ressuspensas em meio RPMI (Sigma) contendo gentamicina, 10% de SBF e 2mM de L-glutamina. As células totais de baço e linfonodos (LNs) foram contadas e ajustadas na concentração de 5×10^6 células/mL e $2,5 \times 10^6$ células/mL, respectivamente.

Cultura de células e quantificação de citocinas

Células esplênicas, de LNs e do SNC foram re-estimuladas *in vitro* para a indução de diferentes citocinas. Para isso as células do baço e LNs foram estimuladas com Con A (10µg/mL) e MOG (20µg/mL) e células do SNC foram estimuladas apenas com MOG (50µg/mL). Após incubação em estufa de CO₂ (37°C / 5%) durante 48 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas. A quantificação de IFN-γ, IL-17, IL-6, TNF-α, IL-5 e IL-10 foi

realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo as instruções dos fabricantes (R&D Systems e BD Biosciences).

Citometria de Fluxo

Baço e LNs foram desagregados, as células coletadas e as hemácias lisadas com tampão contendo NH_4Cl . A suspensão celular foi lavada com meio RPMI 1640 e a concentração foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ células/100 μl . Para a avaliação das Tregs, as células foram incubadas com 0,5 μg de anti-CD4 de camundongo conjugado com FITC e 0,25 μg de anti-CD25 de camundongo conjugado com APC por 20 minutos em temperatura ambiente. Para análise de Foxp3 intracelular foi utilizado o kit comercial anti-mouse/rat Foxp3 conjugado com PE (eBioscience, San Diego, CA, USA), segundo instruções do fabricante. Para a análise das DCs, as células foram incubadas com 0,25 μg de anti-CD11c conjugado com FITC, 0,03 μg de anti-MHCII conjugado com APC e 0,125 μg de anti-CD86 conjugado com PE por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão AutoMacs Running Buffer-Miltenyi Biotec e ressuspensas no mesmo tampão. As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 1% e adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA) do laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital Amaral Carvalho-Jaú-SP. A análise das Tregs foi realizada no software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EUA) e das DCs no software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Spain).

Análise histopatológica

Cérebro e medula espinhal dos animais foram coletados 19 dias após a indução da EAE. Estes órgãos foram fixados em formalina a 10% durante 24 horas, lavados em água corrente por 24 horas e em seguida incluídos em Paraplast Plus (McCormick). As amostras foram cortadas com 5 μm de espessura com auxílio de um micrótomo (Leica, RM2245). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) e três amostras de cada grupo foram analisadas em microscópio óptico (Nikon). As imagens foram adquiridas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio.

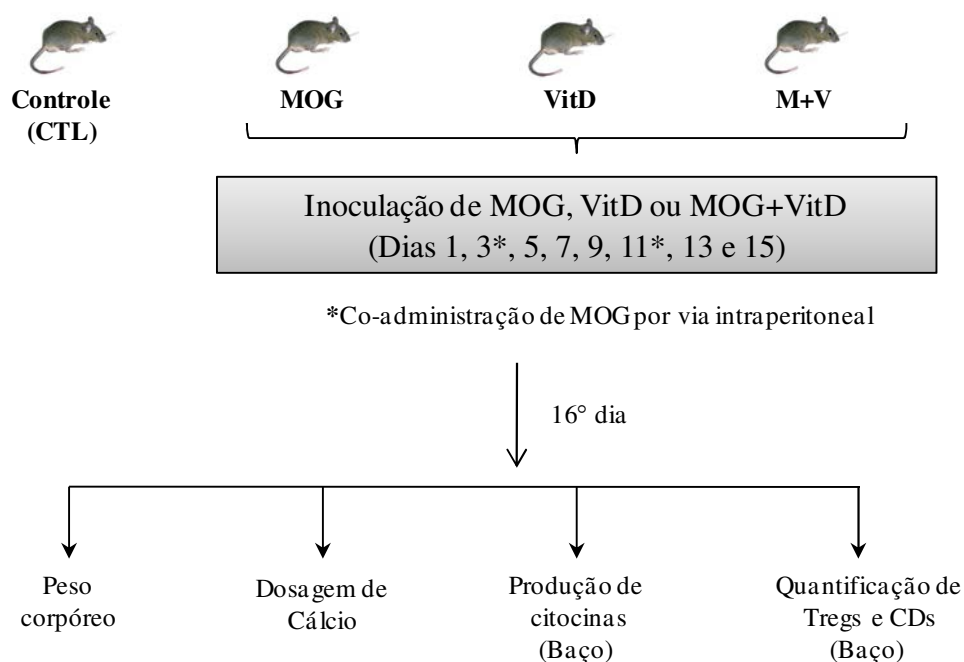
Análise estatística

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Neste caso a comparação entre dois grupos foi realizada por teste t e em mais de três grupos por ANOVA seguida de teste de Tukey. Para as variáveis não paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalos interquartílicos e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. A incidência da doença foi avaliada pelo teste qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaPlot for Windows version 12.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Protocolos & Resultados

Protocolo experimental 1

Objetivo: Avaliar o potencial imunomodulador da associação MOG + VitD *in vivo*.



Resultados

Peso corpóreo e níveis séricos de cálcio

A inoculação de VitD ou da associação MOG+VitD determinaram perda significativa de peso corporal (figura 3A) e também aumento significativo do nível de cálcio sérico como ilustrado na figura 3B. A inoculação isolada de MOG não alterou estes parâmetros.

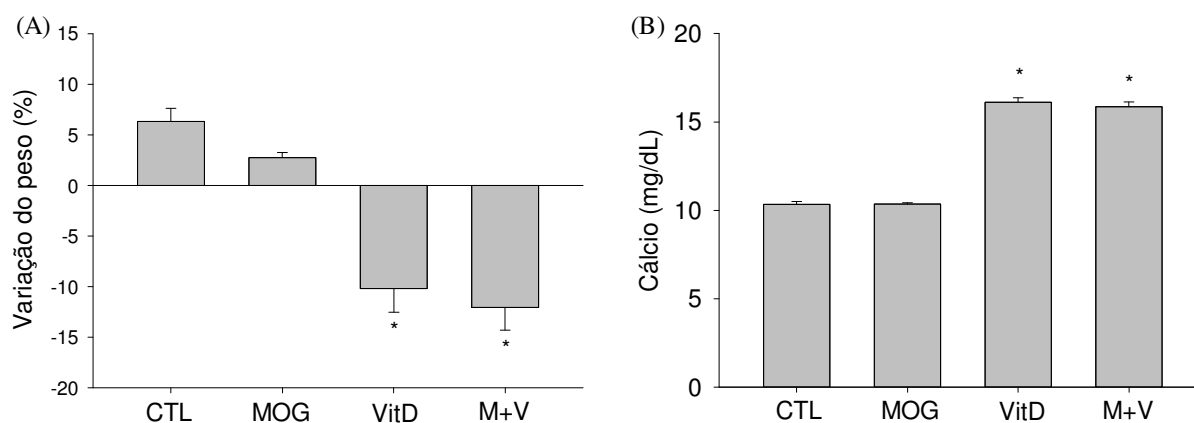


Figura 03. Efeito da inoculação de MOG+VitD no peso corporal e nos níveis séricos de cálcio em camundongos C57BL/6. Peso corpóreo (A) e níveis séricos de cálcio (B). Variação do peso corpóreo analisada entre o 1° e o 15° dia após a inoculação de MOG e VitD. Resultados representam a média $\pm$ DP de 5-6 animais por grupo. * Diferença em relação ao grupo CTL e ao grupo MOG. $p < 0,05$.

Produção de citocinas por células esplênicas

O potencial imunomodulador da associação MOG+VitD foi avaliado por quantificação do nível de citocinas produzido por células esplênicas estimuladas *in vitro* com Con A. De forma geral, o tratamento com VitD ou MOG+VitD diminuiu a produção das citocinas testadas (IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-17), em comparação com o grupo controle não tratado. Nos casos da IL-6 e da IL-17, esta queda foi estatisticamente significativa nestes dois grupos e no caso do TNF- α esta diferença só foi significativa no grupo inoculado com vitamina D. A inoculação de MOG determinou uma discreta redução na produção dos quatro mediadores testados (figura 04).

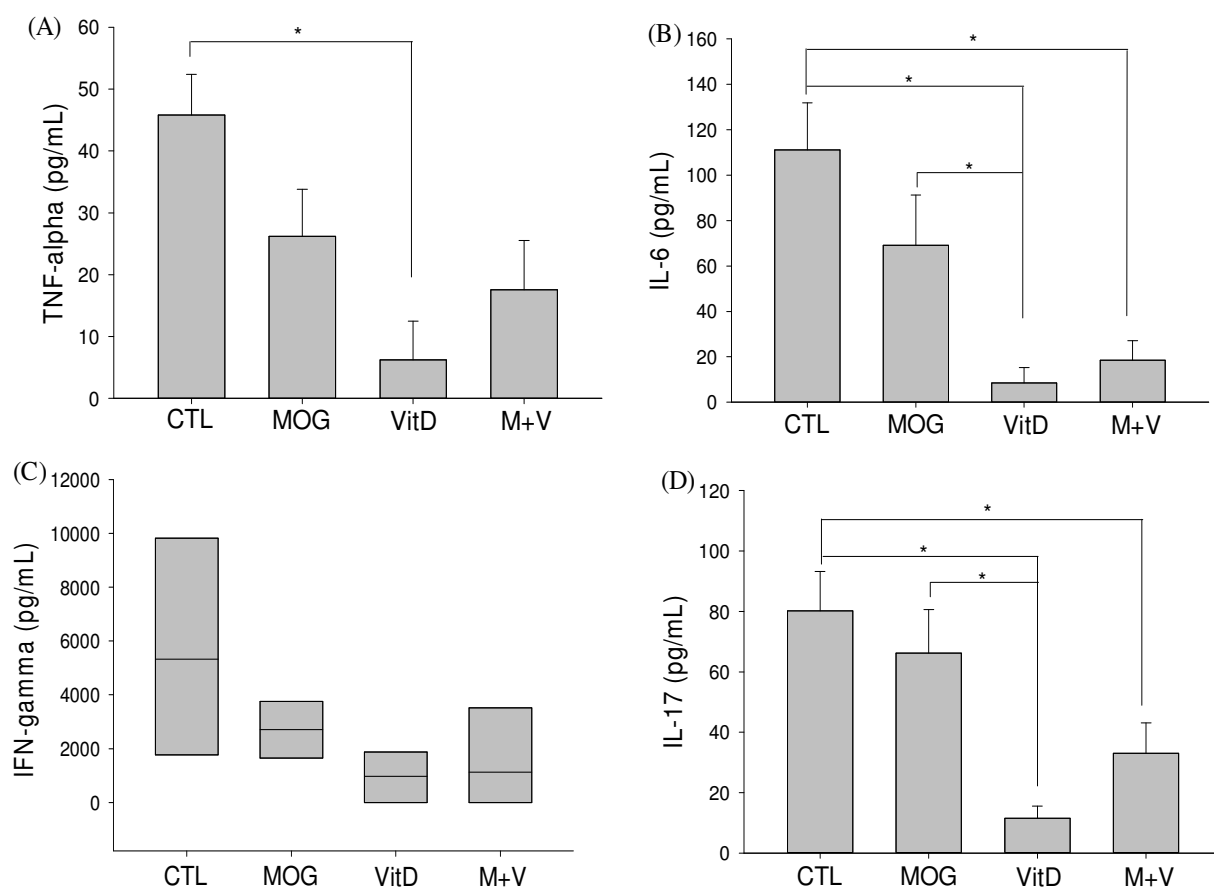


Figura 04. Efeito da inoculação de MOG+VitD na produção de citocinas induzidas por estímulo policlonal em camundongos C57BL/6. Produção de TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C) e IL-17 (D) por células esplênicas reestimuladas *in vitro* com Con A por 48 horas. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 5-6 animais por grupo. * $p<0,05$.

Quantificação de células dendríticas (CD11c+CD86+MHCII+) e T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) no baço

Foram quantificados o número absoluto e a proporção tanto de DCs quanto de Tregs. Como mostrado nas figuras 5A e 5B, apesar de observarmos uma discreta redução na quantidade de células dendríticas CD11c+CD86+MHCII+ nos grupos inoculados em comparação ao controle, esta diferença não foi significativa. Em relação às células CD4+CD25+Foxp3+, observamos um pequeno aumento no número absoluto

destas células nos grupos tratados com MOG ou VitD, mas esta diferença também não foi significativa (figura 5C). A proporção destas células foi similar nos vários grupos e é ilustrada na figura 5D.

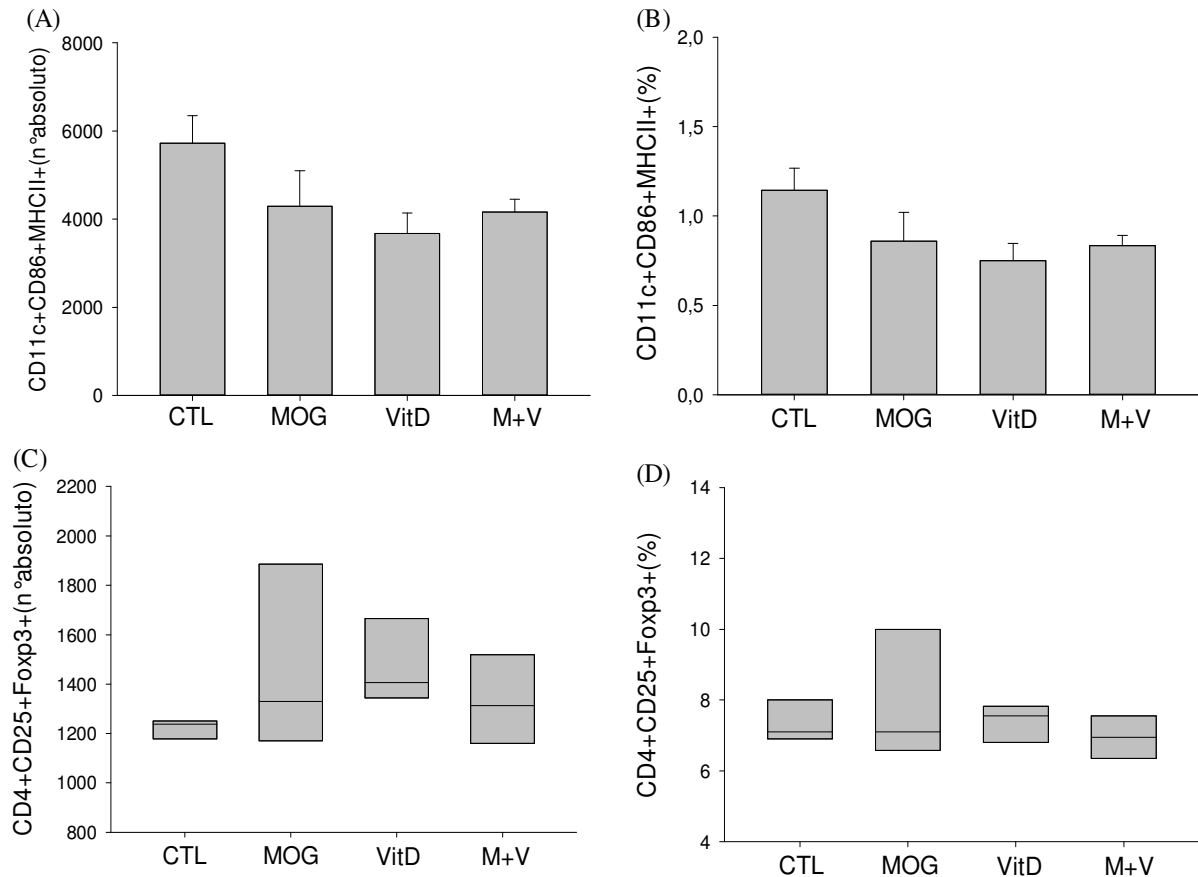
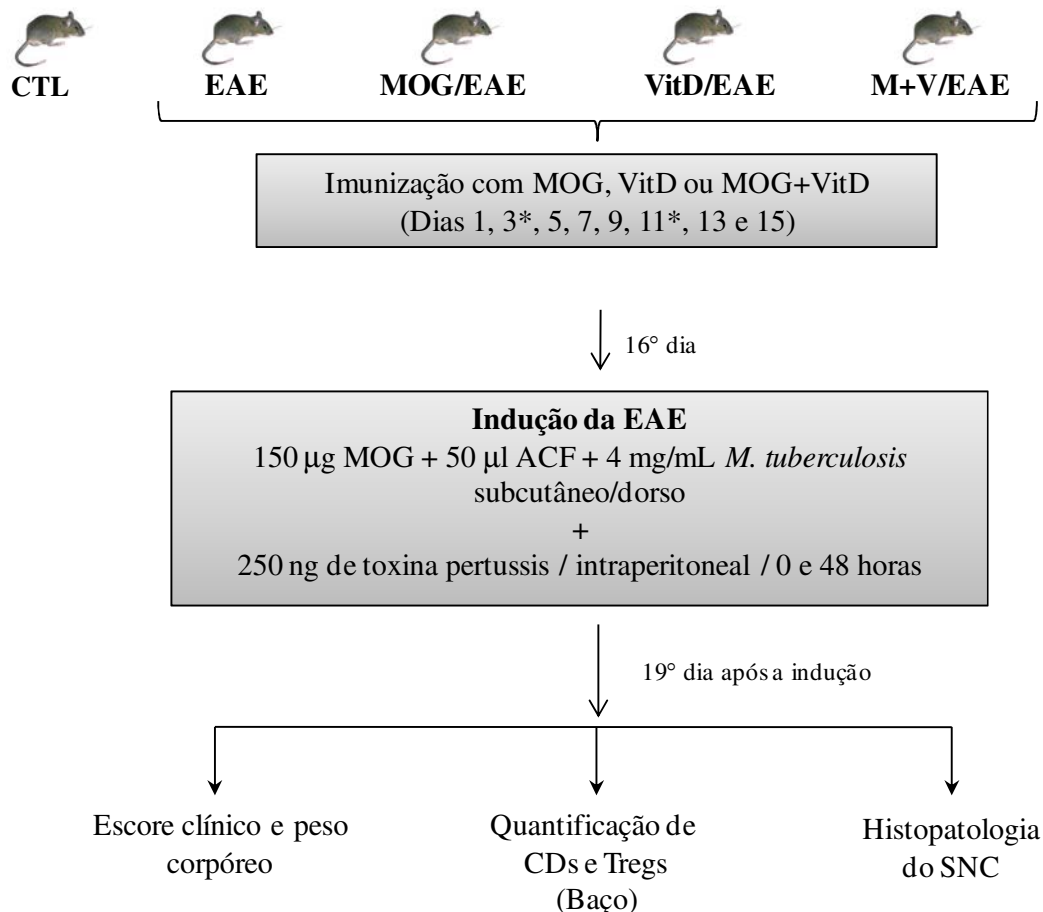


Figura 05. Efeito da inoculação de MOG+VitD na quantidade de células dendríticas e T reguladoras. Número absoluto e percentual de células CD11c+CD86+MHCII+ (A e B) e CD4+CD25+Foxp3+ (C e D) entre as células esplênicas. Os valores de células CD11c+CD86+MHCII+ foram calculados em 500.000 eventos adquiridos. Para análise das CD4+CD25+Foxp3+, foram adquiridos 100.000 eventos e os valores de células foram calculados em relação ao total de linfócitos T CD4+. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 5-6 animais por grupo.

Protocolo experimental 2

Objetivo: Avaliar o efeito profilático da associação MOG + VitD nas características clínicas, histopatológicas e imunológicas da EAE.



Resultados

Desenvolvimento clínico da doença (incidência, escore e peso)

A incidência da doença no grupo EAE foi de 85,71%. A administração prévia de MOG reduziu este valor para 60% enquanto que a administração de VitD não alterou a incidência da doença (83,33%). Entretanto, no grupo previamente inoculado com a associação MOG+VitD nenhum dos animais desenvolveu a doença. Estes resultados são mostrados na figura 6A. A cinética do escore clínico é mostrada na figura 6B. Como pode se observar, todos os grupos, com exceção do MOG+VitD apresentaram os

primeiros sinais clínicos no 13º dia após a indução da doença. A evolução dos sinais clínicos foi mais rápida no grupo EAE do que nos grupos VitD/EAE e MOG/EAE. Os animais do grupo inicialmente injetados com MOG associada à VitD não apresentaram sinais clínicos da doença. O avaliação do escore clínico máximo, mostrado na figura 4C, indicou que a queda no escore clínico do grupo MOG+VitD/EAE foi estatisticamente significativa em relação ao grupo EAE e também em relação ao grupo EAE/VitD.

A variação do peso corporal é mostrada na figura 6D e indica que somente os animais imunizados com MOG associada à VitD apresentaram ganho de peso significativo em relação ao grupo EAE. No grupo inoculado apenas com vitamina D também ocorreu uma recuperação parcial de peso, mas a mesma não foi significativa quando comparada com o grupo controle EAE.

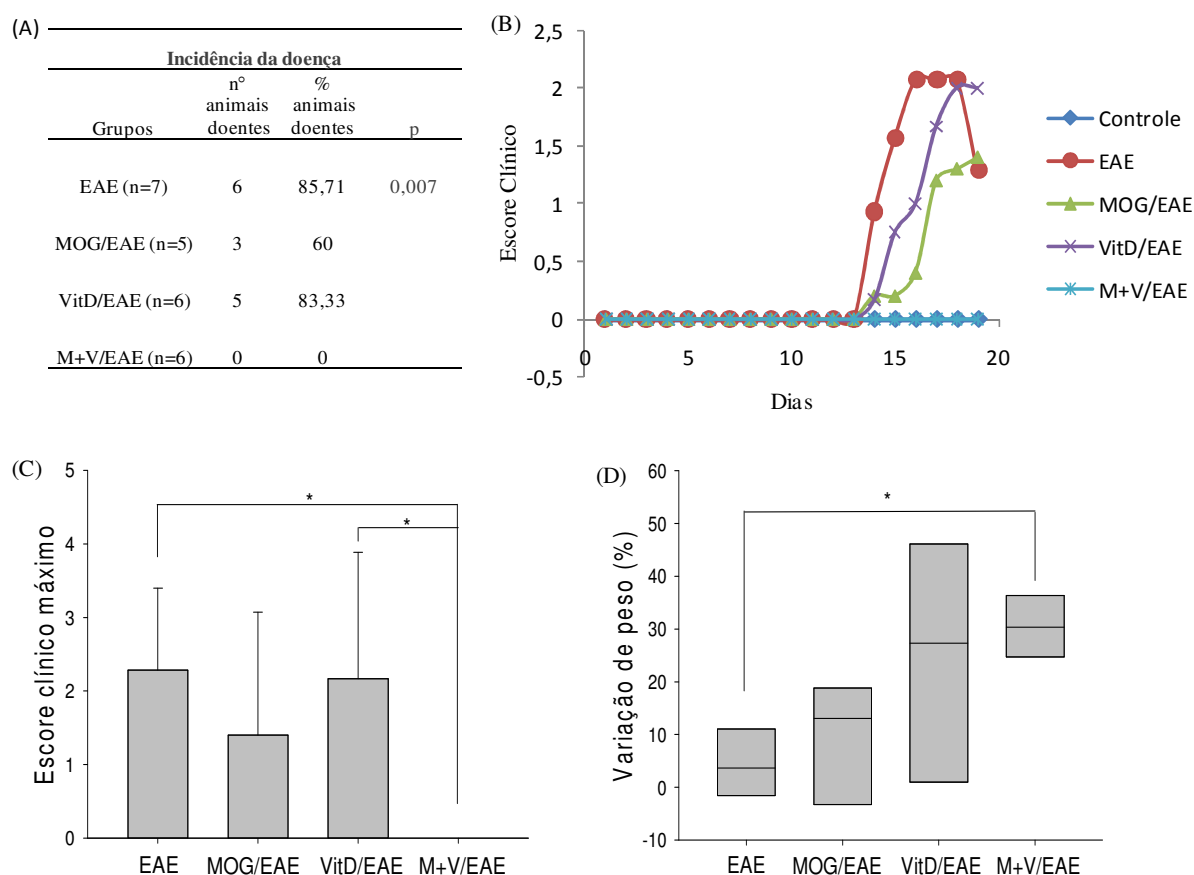


Figura 06. Efeito da imunização prévia com MOG associada à VitD na evolução clínica da EAE. Incidência da EAE (A), escore clínico diário (B), escore clínico máximo (C) e variação de peso (D). Variação de peso analisada entre o 18° e o 1° dia após a indução da EAE. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 5-7 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Quantificação de células dendríticas (CD11c+CD86+MHCII+) e T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) no baço na fase aguda da EAE

Ao quantificarmos as células CD11c+CD86+MHCII+, observamos que o número absoluto e a proporção destas células, nos grupos inoculados com vitamina D, ou MOG associada à VitD, estavam significativamente aumentados em relação ao grupo EAE (figura 7A e B). A quantificação de células CD4+CD25+Foxp3+, não mostrou diferenças entre os grupos (figura 7C e D).

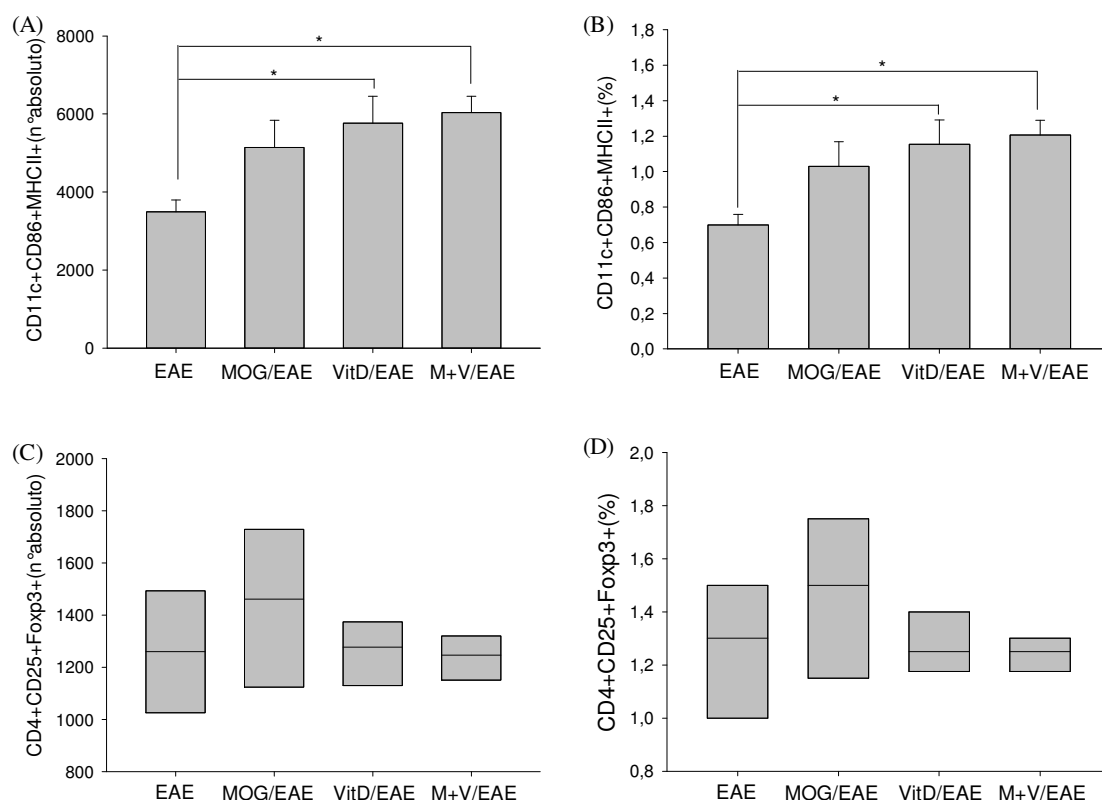


Figura 07. Efeito da imunização prévia com MOG+VitD na quantidade de células dendríticas e T reguladoras. Número absoluto e percentual de células CD11c+CD86+MHCII+ (A e B) e CD4+CD25+Foxp3+ (C e D) foram avaliados no baço na fase aguda da EAE. Os valores de células CD11c+CD86+MHCII+ foram calculados em 500.000 eventos adquiridos. Para análise das CD4+CD25+Foxp3+, foram adquiridos 100.000 eventos e os valores de células foram calculados em relação ao total de linfócitos T CD4+. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 5-6 animais por grupo.

Análise histopatológica do SNC

A figura 8 ilustra os resultados da análise histopatológica realizada em amostras de cérebro e da porção lombar da medula espinhal, coletadas na fase aguda da doença. Como previsto, não detectamos presença de células inflamatórias em amostras oriundas de animais normais. Por outro lado, animais do grupo EAE apresentaram intenso processo inflamatório periférico tanto no cérebro quanto na medula espinhal. O grupo imunizado apenas com MOG apresentou um processo inflamatório similar ao observado no grupo EAE. No grupo injetado com VitD o processo inflamatório foi mais discreto do que nos grupos EAE e MOG/EAE. Diferentemente dos demais grupos com EAE, no grupo imunizado com MOG associada à VitD não detectamos presença de infiltrado inflamatório em nenhuma das amostras analisadas.

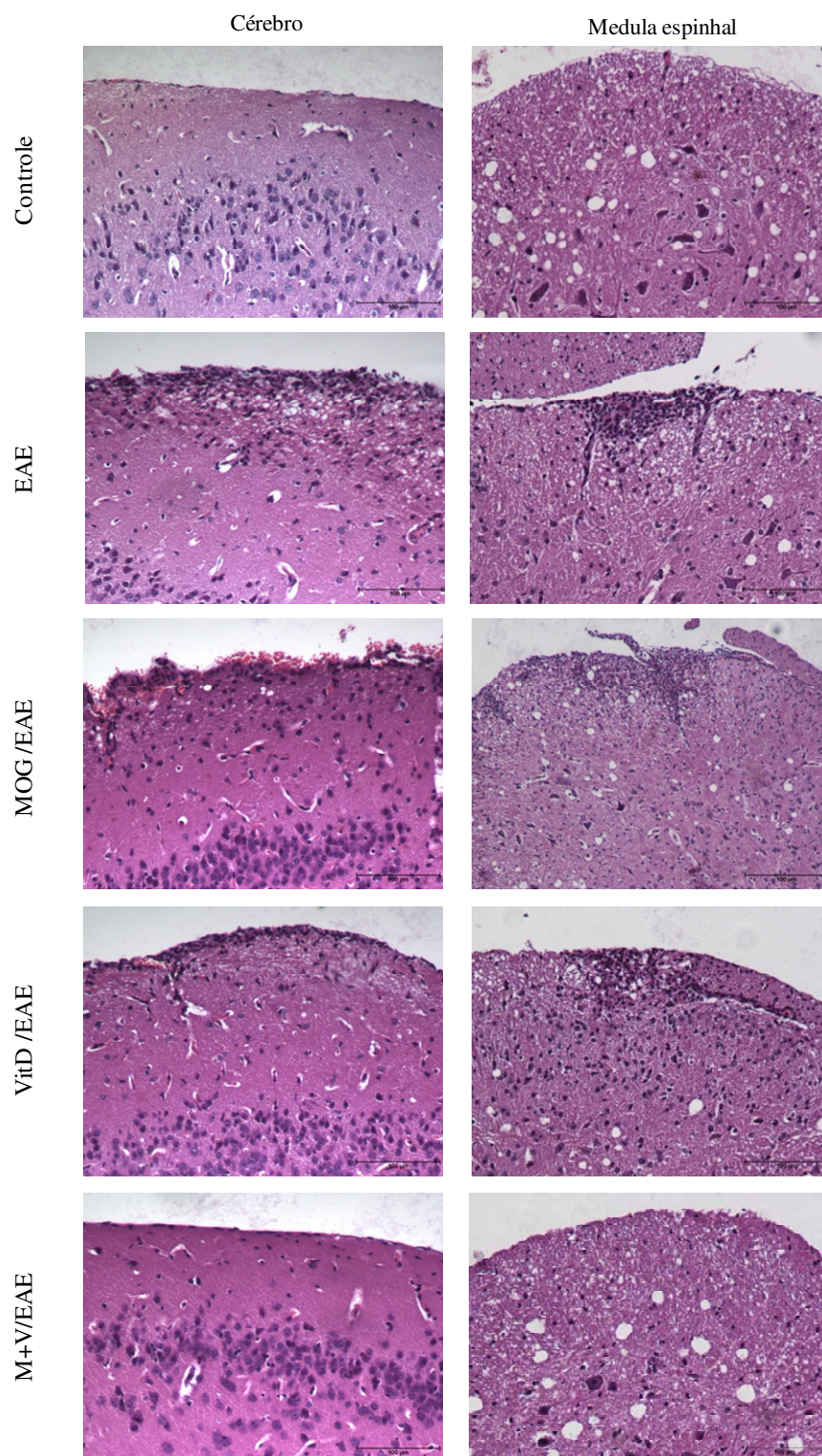
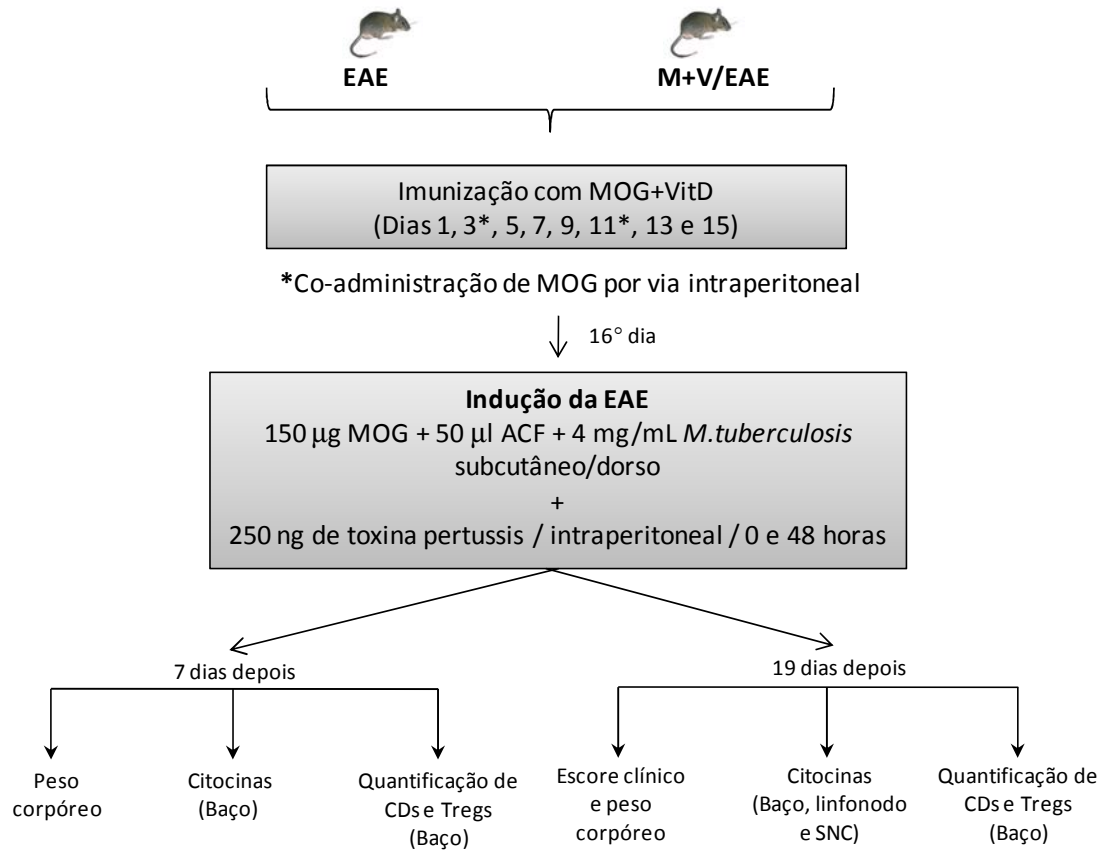


Figura 08. Efeito da imunização prévia com MOG associada à VitD, no processo inflamatório no cérebro e porção lombar da medula espinhal. Análise realizada na fase aguda da EAE. Cortes com 5 μ m de espessura foram corados com H&E e avaliados em microscópio (Nikon) no aumento de 20X. Os painéis representam 3 animais por grupo.

Protocolo experimental 3

Objetivo: Avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na proteção.



Resultados da fase pré-clínica da doença

Cinética e variação do peso corpóreo

Sete dias após a indução da EAE, os animais do grupo imunizado com MOG+VitD ganharam significativamente mais peso do que o grupo EAE quando comparados com seus respectivos pesos iniciais (Figura 09). Este efeito foi atribuído à finalização da administração de VitD a qual desencadeia perda de peso.

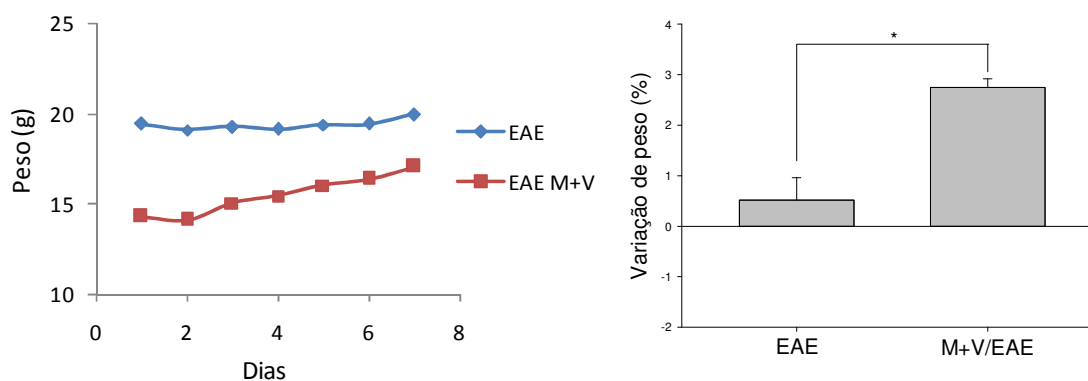


Figura 09. Efeito da imunização prévia com MOG associada à VitD na variação de peso corpóreo avaliado até o 7º dia após a indução da EAE. Cinética (A) e variação de peso corpóreo (B) analisadas entre o 1º e o 7º dia após a indução da EAE. Resultados representam a média $\pm$ DP de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Produção de citocinas por células esplênicas

Quanto à produção de citocinas por culturas reestimuladas *in vitro* com estímulo específico (MOG), observamos redução significativa de TNF- α , IFN- γ e IL-17 no grupo imunizado com MOG+VitD em comparação ao grupo EAE (figura 10A, C e D). O nível de IL-6 também estava menor no grupo previamente imunizado, mas a diferença não foi significativa (figura 10B). Não observamos diferenças entre os grupos em relação às produções de IL-5 e IL-10 (figura 10E e F).

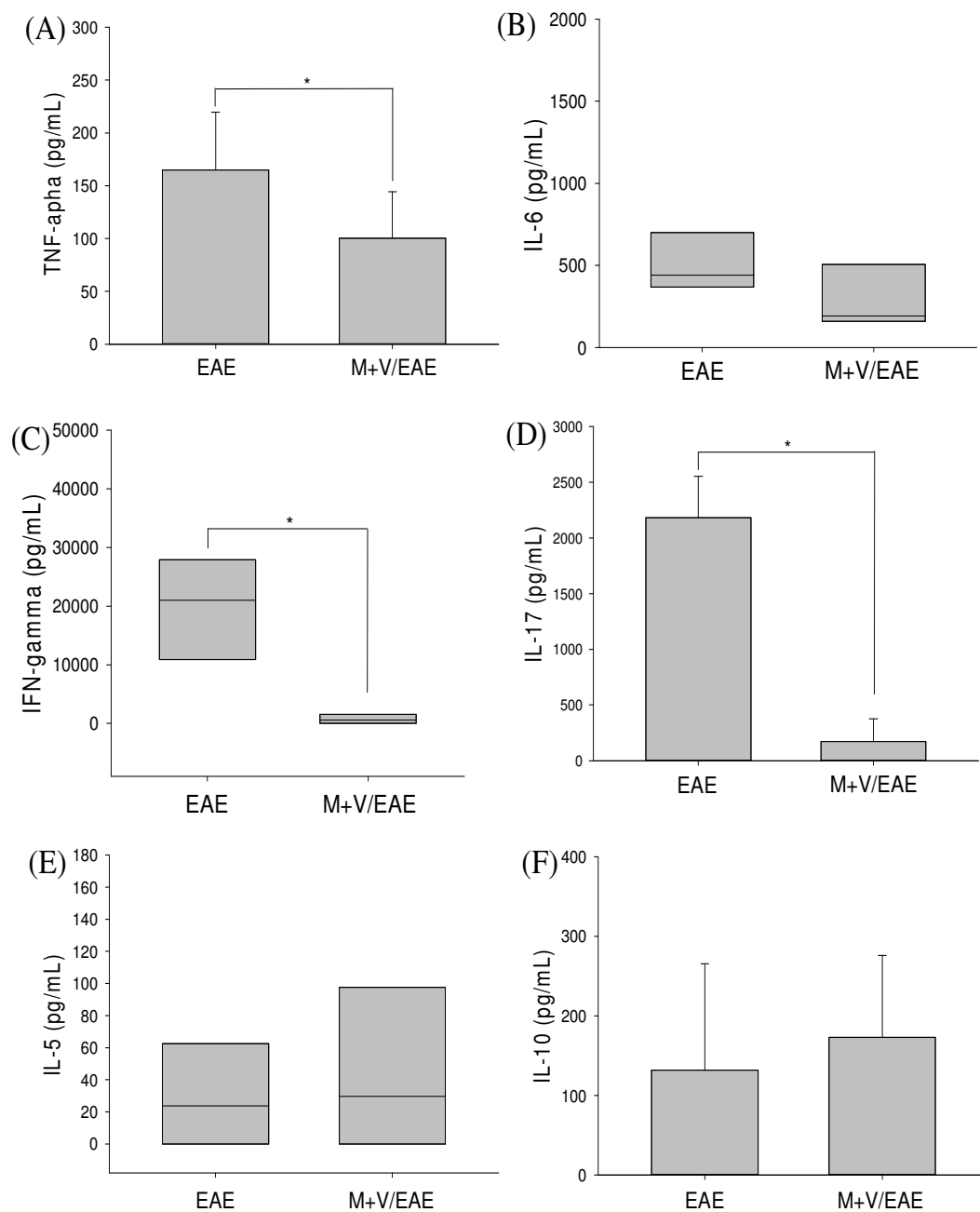


Figura 10. Efeito da imunização prévia com MOG+VitD na produção de citocinas induzidas por estímulo específico durante a fase pré-clínica da doença. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG+VitD e posteriormente submetidos à indução de EAE. Células esplênicas foram obtidas no 7º dia após a indução e reestimuladas *in vitro* com MOG. Os níveis de TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), IL-5 (E) e IL-10 (F) foram avaliados após 48h. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Quantificação de células dendríticas (CD11c+CD86+MHCII+) e T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) no baço

A determinação do número absoluto e percentual de DCs CD11c+CD86+MHCII+ e reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ no baço mostrou redução significativa no grupo previamente imunizado com MOG associada à VitD em relação ao grupo EAE (figura 11).

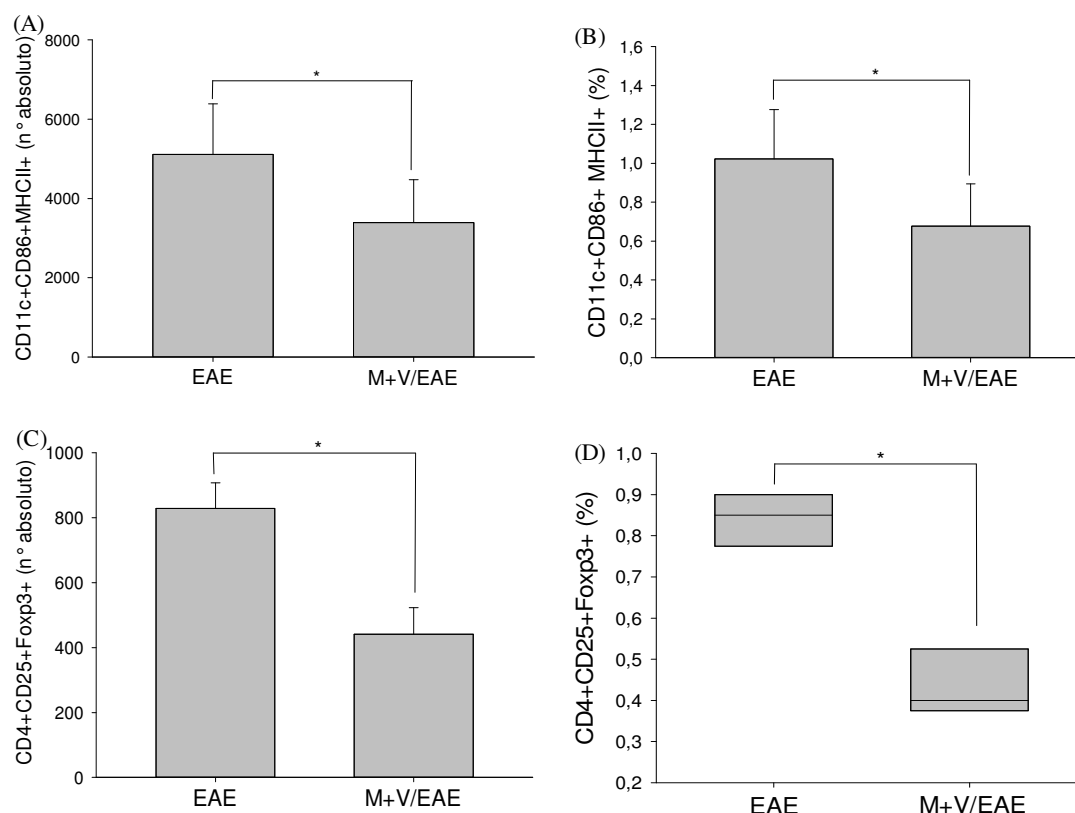


Figura 11. Efeito da imunização prévia com MOG+VitD na quantidade de células dendríticas e T reguladoras. Avaliação realizada durante a fase pré-clínica da EAE. Número absoluto e percentual de células CD11c+CD86+MHCII+ (A e B) e CD4+CD25+Foxp3+ (C e D) entre as células esplênicas. Os valores de células CD11c+CD86+MHCII+ foram calculados em 500.000 eventos adquiridos. Para análise das CD4+CD25+Foxp3+, foram adquiridos 100.000 eventos e os valores de células foram calculados em relação ao total de linfócitos T CD4+. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Resultados da fase aguda da doença

Desenvolvimento clínico da doença (incidência, escore e peso)

Os animais do grupo EAE apresentaram os primeiros sinais clínicos no 11º dia após a indução da doença conforme mostrado na figura 12A. A incidência da doença neste grupo foi de 100%. No grupo previamente imunizado com a associação MOG+VitD nenhum animal desenvolveu a doença (figura 12C). O cálculo do escore clínico máximo, mostrado na figura 12B, permite visualizar de forma evidente a diferença entre os dois grupos experimentais.

A avaliação do peso realizada 19 dias após a indução da doença mostra um aumento significativamente maior de peso corpóreo no grupo imunizado do que no grupo EAE (figura 12D).

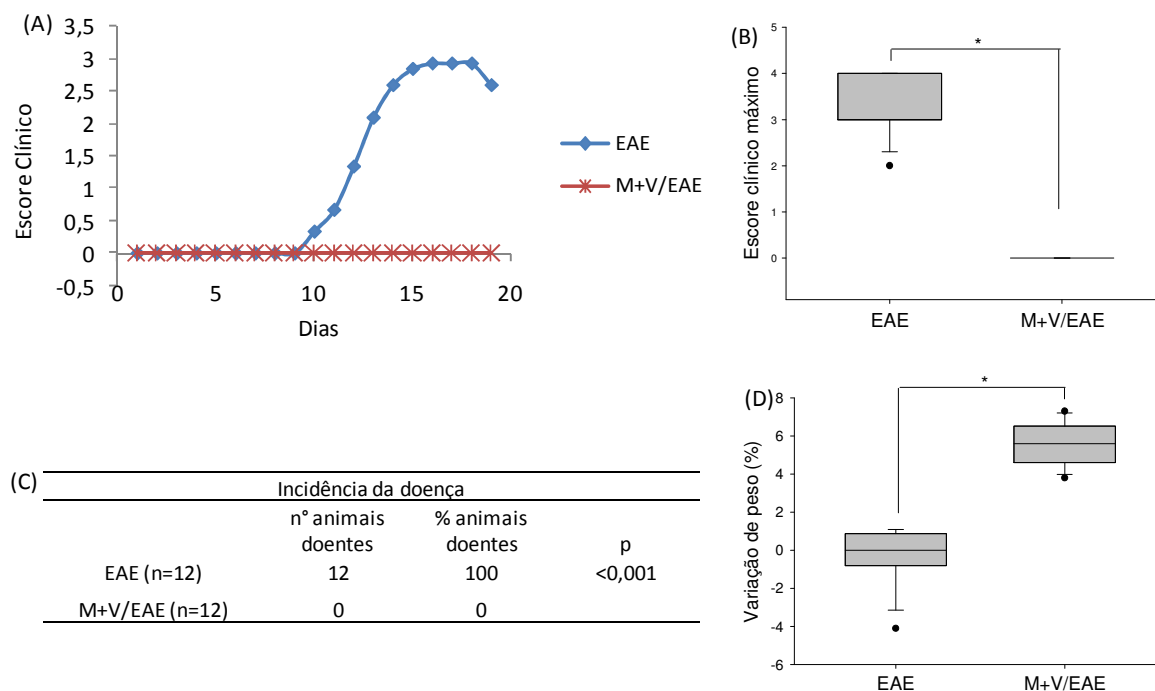


Figura 12. Efeito da imunização prévia com MOG associada à VitD na evolução clínica da EAE. Escore clínico diário (A), média do escore clínico máximo (B), incidência da doença (C) e variação do peso (D) avaliados na fase aguda da doença. Variação de peso analisada entre o 19º e o 1º dia após a indução da EAE. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos de 12 animais por grupo. *p<0,05.

Produção de citocinas por células esplênicas

A produção de todas as seis citocinas testadas (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17, IL-5 e IL-10) foi significativamente menor no grupo previamente imunizado como mostrado na figura 13.

No caso de culturas de células esplênicas estimuladas com Con A, observamos redução significativa na produção de TNF- α e IL-5 no grupo imunizado com MOG associada à VitD. A produção das demais citocinas avaliadas (IL-6, IFN- γ , IL-17 e IL-10) foi similar entre os dois grupos. Estes resultados são mostrados na figura 14.

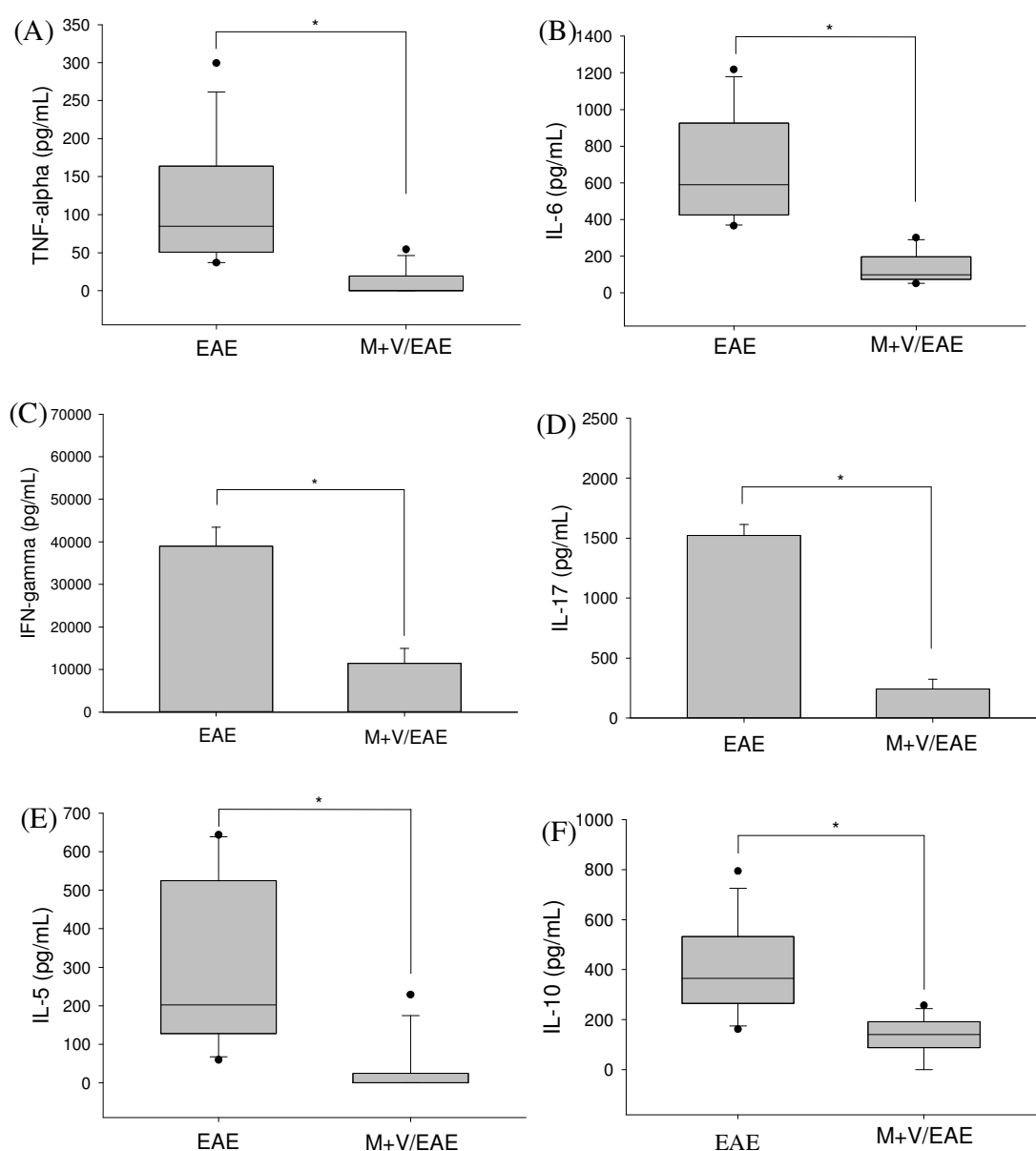


Figura 13. Efeito da imunização prévia com MOG+VitD na produção de citocinas induzidas por estímulo específico durante a fase aguda da doença. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG+VitD e posteriormente submetidos à indução de EAE. Células esplênicas foram obtidas na fase aguda (19º dia) da doença e reestimuladas *in vitro* com MOG. Os níveis de TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), IL-5 (E) e IL-10 (F) foram avaliados após 48h. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 12 animais por grupo. * $p < 0,05$.

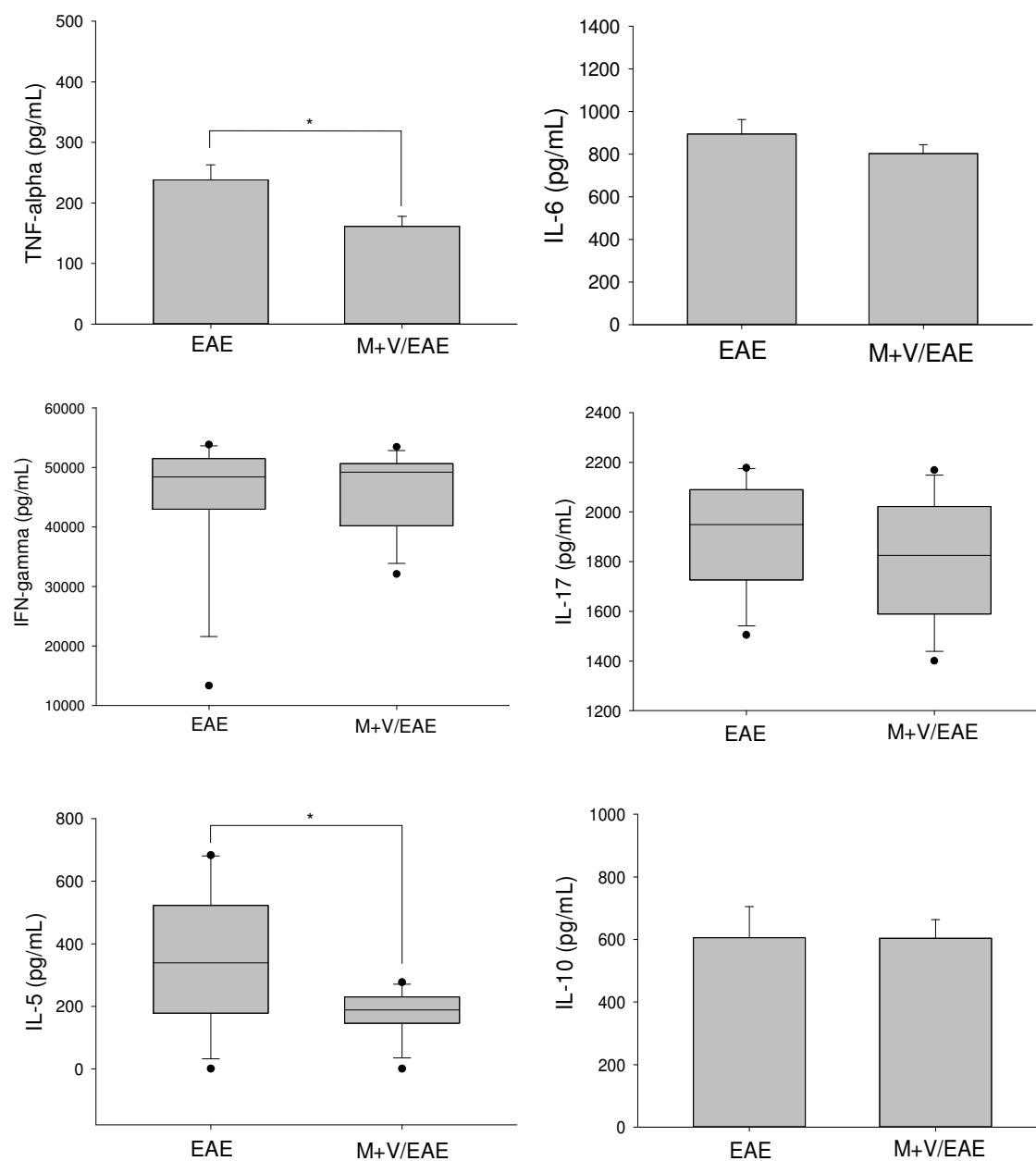


Figura 14. Efeito da imunização com MOG+VitD antes da indução de EAE na produção de citocinas induzidas por estímulo policlonal durante a fase aguda da doença. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG+VitD e posteriormente submetidos à indução de EAE. Células esplênicas foram obtidas na fase aguda (19º dia) da doença e reestimuladas *in vitro* com Con A. Os níveis de TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), IL-5 (E) e IL-10 (F) foram avaliados após 48h. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 12 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Produção de citocinas por células de linfonodos

Células de LNs do grupo previamente imunizado, reestimuladas com MOG, produziram quantidades significativamente mais baixas de TNF- α , IFN- γ e IL-17 (figura 15 A, C e D). O grupo imunizado também apresentou uma redução na produção de IL-6 e IL-5, mas sem diferença estatística (figura 15 B e E). A produção de IL-10 foi similar nos dois grupos (figura 15F).

Nas culturas de LNs reestimuladas com Con A, observamos uma redução significativa de IL-6 no grupo imunizado com a associação MOG+VitD em relação ao grupo EAE (figura 16B). A produção de IL-17, IL-5 e IL-10 foi similar nos dois grupos (figura 16D, E e F). Embora a produção de TNF- α tenha sido menor no grupo imunizado, a diferença não foi significativa (figura 16A).

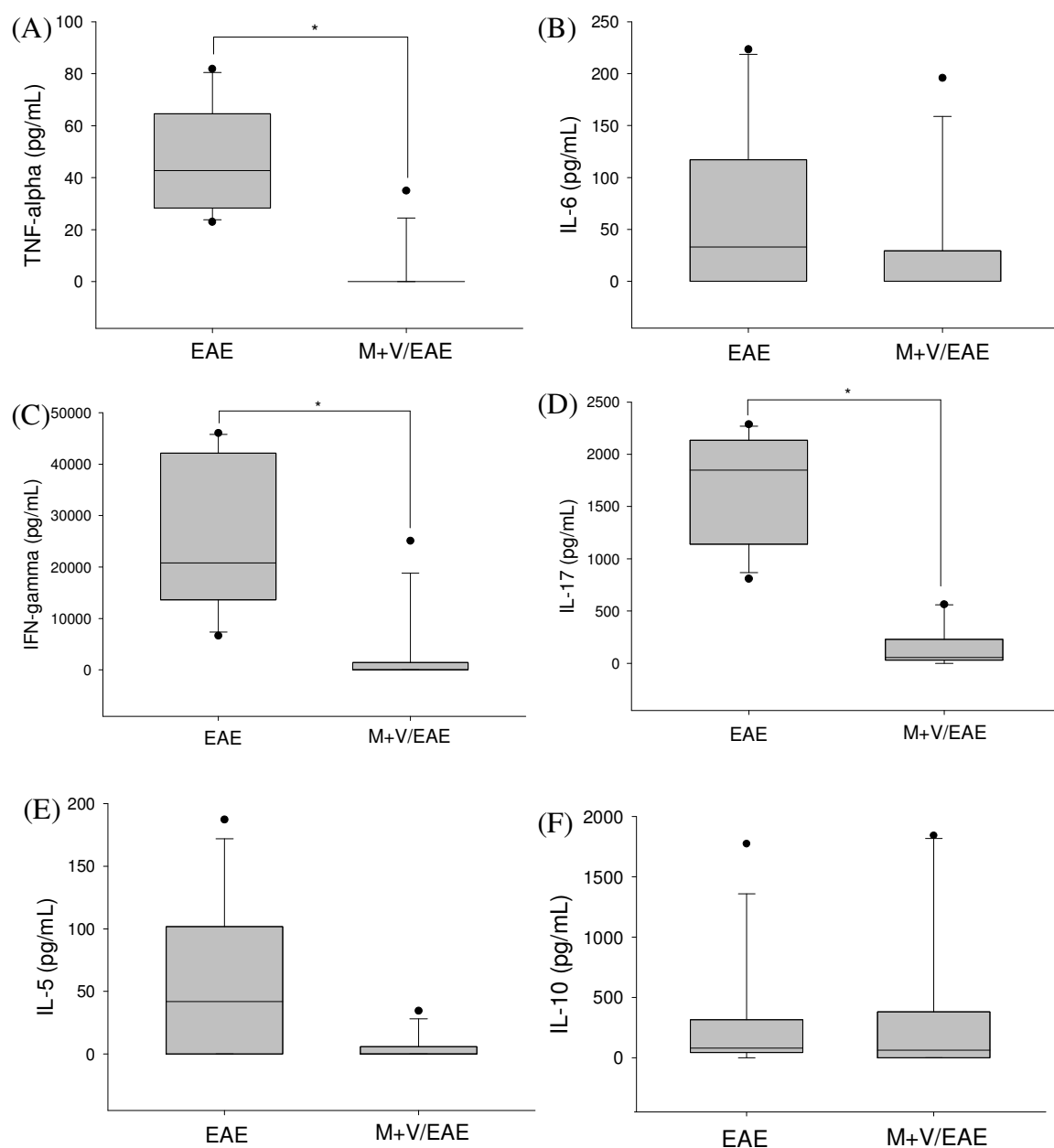


Figura 15. Efeito da imunização prévia com MOG+VitD na produção de citocinas induzidas por estímulo específico durante a fase aguda da doença. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG+VitD e posteriormente submetidos à indução de EAE. Os linfonodos inguinais e poplíteos foram obtidos na fase aguda (19º dia) da doença e reestimulados *in vitro* com MOG. Os níveis de TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), IL-5 (E) e IL-10 (F) foram avaliados após 48h. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 12 animais por grupo. *p<0,05.

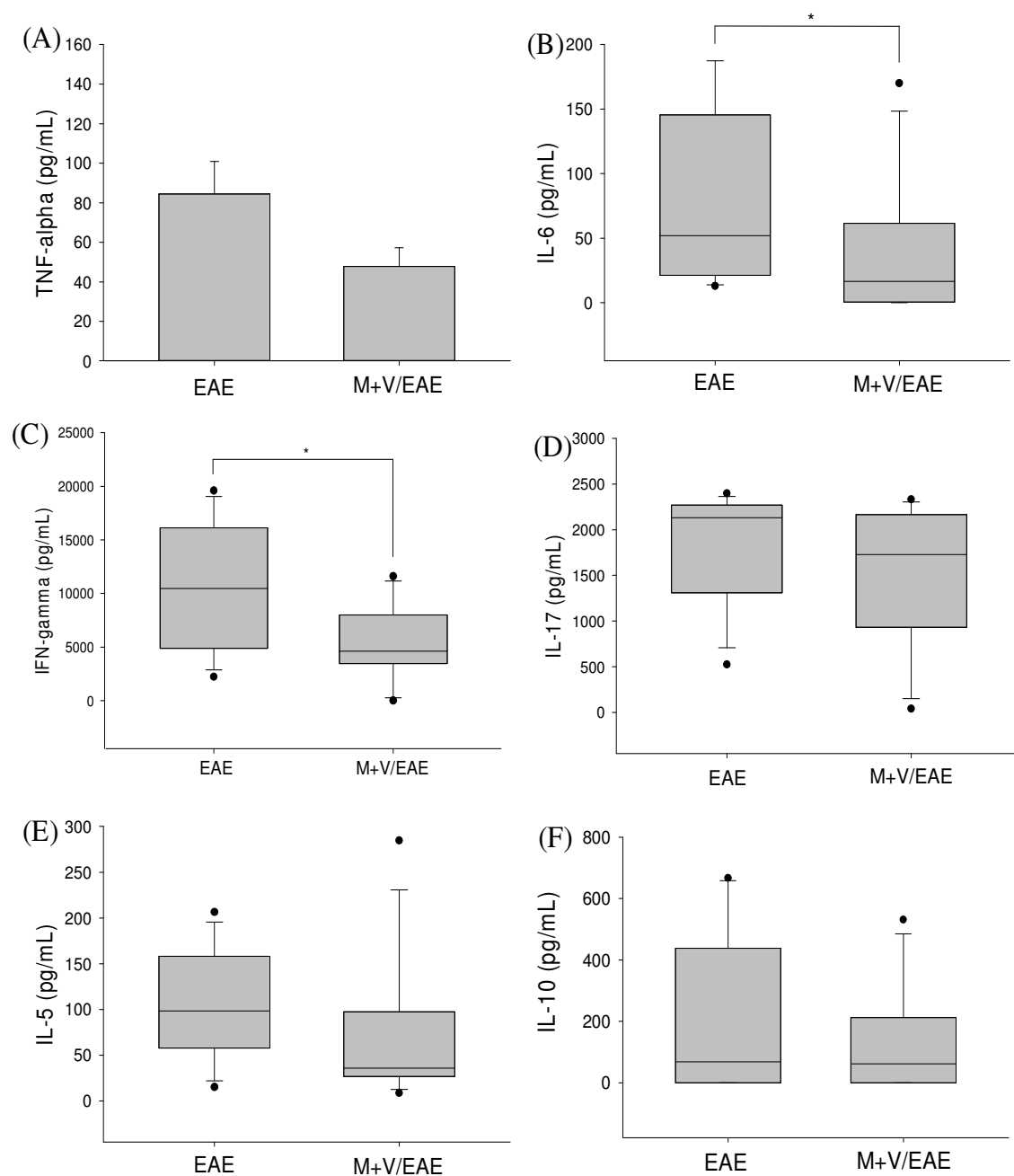


Figura 16. Efeito da imunização prévia com MOG+VitD na produção de citocinas induzidas por estímulo policlonal durante a fase aguda da doença. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG+VitD e posteriormente submetidos à indução de EAE. Os linfonodos inguinais e poplíteos foram obtidos na fase aguda (19º dia) da doença e reestimulados *in vitro* com Con A. Os níveis de TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), IL-5 (E) e IL-10 (F) foram avaliados após 48h. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 12 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Produção de citocinas por células do SNC

A produção de TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17 e IL-10 por células mononucleares eluídas do SNC de animais previamente imunizados foi significativamente menor do que a produzida por animais do grupo EAE. Os níveis de IL-5 também foram mais baixos no grupo imunizado, mas esta diferença não foi significativa. Estes resultados são ilustrados na figura 17.

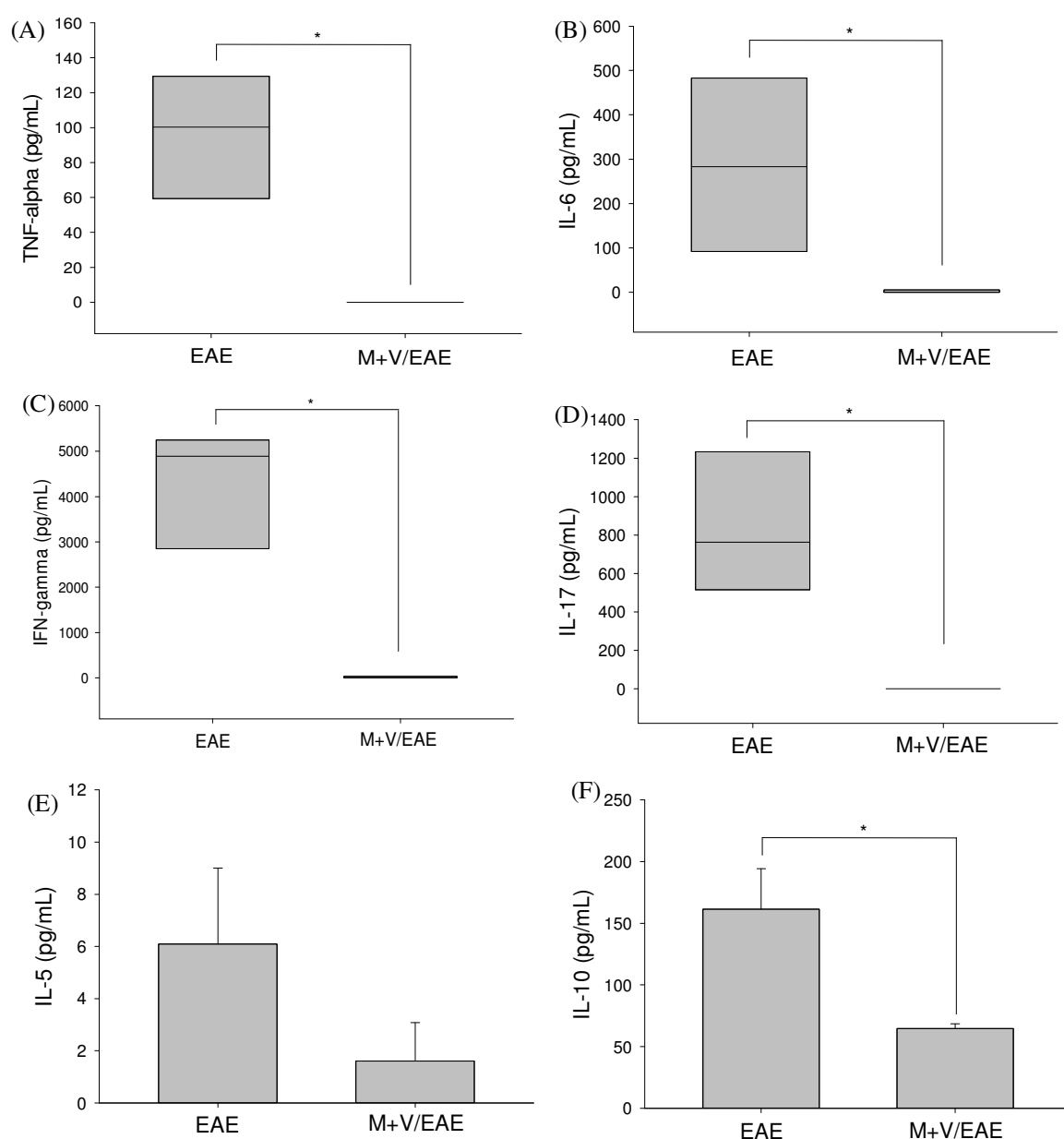


Figura 17. Efeito da imunização prévia com MOG+VitD na produção de citocinas induzidas por MOG em células mononucleares do SNC durante a fase aguda da doença. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG+VitD e posteriormente submetidos à indução de EAE. Células mononucleares do SNC (cérebro e medula cervical, torácica e lombar) foram obtidas na fase aguda (19º dia) da doença e reestimuladas *in vitro* com MOG. Os níveis de TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), IL-5 (E) e IL-10 (F) foram avaliados após 48h. Resultados representam a mediana e intervalos interquartílicos ou a média $\pm$ DP de 4 pools de animais por grupo (cada pool é constituído de 3 animais). * $p < 0,05$.

Discussão

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se a associação de MOG e VitD tem atividade profilática na EAE. A hipótese de que isto poderia ocorrer foi baseada em dados da literatura que atestam a ampla atividade imunomoduladora desta vitamina (Baek et al., 2010; Mora et al., 2008) e também em dados do nosso grupo que mostraram que a VitD determina atividade tolerogênica específica quando associada com a MOG (Chiuso-Minicucci et al., 2014, submetido).

Iniciamos este trabalho comparando o efeito da administração de MOG, VitD e MOG associada à VitD em camundongos C57BL/6, os quais são empregados na indução do modelo experimental de encefalomielite adotado. Para isto utilizamos um esquema de administração de VitD, em dias alternados, durante 2 semanas. A MOG foi co-administrada nos dias 3 e 11. Grupos inoculados apenas com MOG ou só com VitD foram utilizados como controles. Apesar da administração de MOG+VitD não ter alterado a quantidade de DCs e de Tregs, esta associação determinou, de forma geral, queda nos níveis de TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-17. Estes resultados são condizentes com o efeito imunomodulador da VitD (Chang et al., 2010; Almerighi et al., 2008). Alguns efeitos colaterais indesejáveis foram constatados, como pode ser observado nos animais tratados com vitamina D nos quais a perda de peso foi significativamente maior do que no grupo controle ou no grupo injetado apenas com MOG. Estes mecanismos não foram avaliados, mas estudos *in vitro* sugerem que a vitamina D pode atuar a nível molecular diminuindo a adipogênese, através da inibição do receptor de vitamina D e da expressão do regulador principal da adipogênese (PPAR- γ), reduzindo consequentemente sua atividade (Wood, 2008). Além da perda de peso, a vitamina D também desencadeou hipercalcemia. Estudos futuros permitirão definir se análogos da VitD destituídos destes efeitos colaterais conservam este efeito imunoregulador protetor quando associados a MOG.

Em seguida testamos a possibilidade de que esta associação pudesse desencadear um efeito protetor contra a EAE. O efeito profilático observado foi altamente significativo. Camundongos C57BL/6 previamente inoculados com MOG+VitD ficaram completamente protegidos, ou seja, não desenvolveram sinais clínicos (perda de peso e paralisia) indicadores de encefalomielite. Além disto, a incidência da doença

neste grupo foi de 0% comparativamente ao grupo EAE que apresentou incidência de 85% a 100%. A inoculação só de MOG ou só de VitD determinou um efeito protetor discreto. A análise histopatológica do SNC foi condizente com os achados clínicos, ou seja, não observamos presença de infiltrados inflamatórios evidentes no cérebro e porção lombar da medula espinhal destes animais previamente inoculados com MOG+VitD. Pelo que conhecemos da literatura este achado é inédito. A idéia de utilizar neuro-antígenos isolados para induzir tolerância específica na EM, ou mesmo de outros antígenos específicos em outras patologias autoimunes, não é recente. Várias estratégias empregando MOG (peptídeo integrante da bainha de mielina) têm sido propostas, testadas e se mostrado promissoras. Por exemplo, *Levy-Barazany et al.* (2014), utilizando camundongos NOD como modelo de EAE demonstraram que a administração nasal de MOG depois do primeiro surto, seguida de doses semanais, reduziu o escore clínico e a infiltração de células no SNC. A MOG também se mostrou eficaz quando administrada sob a forma de vacina genética (Fissolo et al., 2012) ou como parte de proteínas de fusão (Divekar, 2011; Rynda-Apple et al., 2011). Entretanto, a utilização de VitD como adjuvante tolerogênico quando associada à um antígeno específico, é um achado novo na área das doenças autoimunes.

Para esclarecer, pelo menos parcialmente, os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos neste efeito protetor, analisamos alguns parâmetros que são considerados críticos no desenvolvimento e/ou controle dos processos autoimunes. Estas análises foram feitas nas fases pré-clínica e clínica da EAE. No sétimo dia após a indução da EAE (fase pré-clínica) a produção de citocinas encefalitogênicas (TNF- α , IFN- γ e IL-17) induzidas com o antígeno específico, estava significativamente diminuída em comparação com o grupo controle. Os níveis similares de IL-5 e IL-10 nos dois grupos experimentais mostraram que a queda nos níveis das citocinas pró-inflamatórias não foi determinada por aumento destas duas citocinas com características anti-inflamatórias. A quantificação de DCs por citometria de fluxo, neste período, indicou que o número de DCs maduras (CD25+CD86+MHCII+) estava significativamente menor no grupo previamente imunizado. Este achado é muito interessante porque a maturação das DCs é fundamental para a montagem da resposta imune específica (Banchereau & Steinman, 1998). Neste contexto, a presença de um número significativamente menor de DCs maduras no baço dos animais previamente

injetados com MOG+VitD, sugere que a imaturidade destas células apresentadoras de antígenos poderia causar esta queda na resposta autoimune. Este resultado foi considerado especialmente importante porque as DCs têm sido apontadas como um alvo promissor de imunomodulação nas doenças autoimunes (Segovia-Gamboa et al., 2014; Kavousanaki et al., 2010; Pedersen et al., 2007). Em outros modelos experimentais foram observados resultados similares. Camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram tratados com VitD antes e depois da infecção e foi constatado que a mesma inibiu a diferenciação de DCs, resultando em menor migração celular para o cérebro (He et al., 2014). No caso da EAE, foi demonstrado que a transferência adotiva de DCs tolerogênicas, induzidas por vitamina D3 em ratos Lewis, desencadeou uma menor resposta inflamatória no SNC, resultando em diminuição da gravidade da doença (Farias et al., 2013).

A concepção de que células T reguladoras são relevantes para o controle dos processos inflamatórios infecciosos ou de origem autoimune é fortemente baseada na literatura (Smigiel et al., 2014; Harishankar et al., 2014). Tem sido constatado que a presença de VitD em diferentes cenários terapêuticos promove uma frequência aumentada de células Tregs Foxp3+ (Takeda et al., 2010; Jeffery et al., 2009). Por isto esperávamos que o número de células T reguladoras do tipo CD4+CD25+Foxp3+ fosse maior no grupo imunizado com MOG+VitD. Entretanto, o número destas células estava significativamente diminuído neste grupo. A interpretação mais imediata deste resultado inesperado é que esta queda no número de células Tregs ocorreu em função da redução acentuada na resposta imune antígeno-específica. Esta redução parece ter sido causada pela presença do antígeno específico juntamente com a diminuição da maturação de células dendríticas CD11c+CD86+MHCII+. Neste ambiente, ou seja, na ausência de um processo pró-inflamatório acentuado, não ocorreu ativação de clones antígeno específicos e, portanto, não houve necessidade da expansão de células T reguladoras. Alguns dados da literatura suportam esta hipótese. Por exemplo, a maturação de DCs é considerada essencial para a apresentação imunogênica de antígenos e conseqüente migração das diferentes subpopulações de células T para o sítio-alvo da resposta imune (Steinman & Hemmi, 2006). Além disto, subpopulações de Tregs antígeno-específicas se diferenciam em ambientes nos quais citocinas pró-inflamatórias estão presentes (Korn et al., 2007). Neste sentido, um resultado similar ao nosso foi recentemente

publicado por Weber *et al.* (2014). Estes autores observaram que o efeito terapêutico da atorvastatina na EAE foi associado com redução na expansão de células T encefalitogênicas e também com diminuição de quantidade de T reguladoras. Nossa hipótese é que a apresentação do antígeno pelas DCs imaturas tenha sido a causa da tolerização e, portanto, da eficácia profilática. A indução de anergia ou apoptose de células T antígeno-específicas desencadeada pelas DCs imaturas, como descrito na literatura poderia ser a causa do efeito profilático observado (Süss *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2010).

De forma similar ao que observamos na fase pré-clínica da EAE, na fase clínica da doença constatamos que a produção diferencial de citocinas pró-inflamatórias (maior no grupo EAE do que no grupo previamente imunizado) continuou ocorrendo. Entretanto, constatamos que os níveis de IL-5 e IL-10 estavam significativamente maiores no grupo EAE. Nossa interpretação deste achado é que no animal doente (grupo EAE) o próprio sistema imune tenta controlar o processo inflamatório através da produção destas citocinas. A participação da IL-10 como uma citocina importante na EAE tem amplo suporte na literatura. Tem sido demonstrado por vários experimentos *in vivo* que esta é a principal citocina envolvida na recuperação da EAE. Por exemplo, a administração repetida de IL-10 recombinante durante a fase inicial da doença diminuiu a gravidade das manifestações clínicas (Rott *et al.*, 1994). Experimentos com animais *knockouts* para IL-10 confirmaram a importância desta citocina no controle da EAE (Selvajara & Genger, 2008; Zhang *et al.*, 2004). Nos últimos tempos a célula B tem sido sugerida como uma das fontes mais relevantes de IL-10 tanto na EAE quanto na EM (Ray *et al.*, 2011). Também tem sido sugerido que Bregs (células B reguladoras) seriam mais relevantes na regulação da resposta imune periférica enquanto que T CD4+CD25+ seriam mais atuantes no SNC durante a EAE (McGeachy & Anderton, 2005). Já a participação da IL-5 na EAE não está clara. Weir *et al.* (2003), demonstraram que animais C57BL/6 *knockouts* para IL-5 e imunizados com MOG, desenvolveram a doença de forma similar, sugerindo que esta citocina não teria um papel regulador no desenvolvimento da doença. Por outro lado, Nygårdas *et al.* (2011), demonstram que o tratamento com um vetor viral (herpes simplex) expressando IL-5 melhorou a EAE e diminuiu o infiltrado inflamatório no cérebro destes animais. Neste contexto, seria

muito esclarecedor avaliar o número de células B e T CD4+CD25+Foxp3- produtoras de IL-10 na periferia e também no SNC destes dois grupos experimentais.

As análises feitas com as células eluídas do SNC permitiram, em primeiro lugar, confirmar que o número de células que atingiu este local foi realmente muito menor no grupo previamente imunizado, o que confirmou o resultado da histopatologia. O estímulo destas células com MOG mostrou que as mesmas não eram produtoras das citocinas encefalitogênicas testadas. Além disto, e talvez este seja o aspecto mais significativo, estas células eram produtoras de IL-5 e IL-10. Portanto, o efeito profilático da associação MOG+VitD envolve uma infiltração discreta de células no SNC que são produtoras de citocinas anti-inflamatórias. Neste contexto, a avaliação dos níveis de TGF- β que é uma citocina com reconhecida atividade imunossupressora na EAE (Huss et al., 2011) poderia ser bastante esclarecedora.

Considerando que este efeito protetor não foi observado quando os animais foram injetados apenas com MOG ou só com VitD, atribuímos o mesmo a um efeito sinérgico entre estas duas substâncias. Também acreditamos que a VitD está funcionando como um adjuvante tolerogênico. É possível também conjecturar que a VitD possa funcionar como um adjuvante tolerogênico quando associada com outros antígenos específicos. Se isto se comprovar, a VitD pode ser explorada tanto na profilaxia quanto na terapia de diferentes doenças autoimunes. Esta potencialidade dos imunossupressores como adjuvantes tolerogênicos só foi aventada mais recentemente. *Kang et al.* (2008), demonstraram que camundongos BALB/c, anteriormente sensibilizados com OVA, poderiam ser dessensibilizados pelo tratamento concomitante com um peptídeo de OVA e dexametasona. O mecanismo tolerogênico incluiu um bloqueio na maturação de DCs e também uma expansão de células Tregs Foxp3+. Estes autores também demonstraram que esta droga era tolerogênica e profilática quando associada com um peptídeo da insulina no modelo NOD de diabetes. A eficácia deste conceito foi também testada na EAE. *Kang et al.* (2012), utilizaram FK506 como um adjuvante tolerogênico combinado com uma vacina de DNA cujo gene inserido codificava MOG. Esta combinação preveniu o desenvolvimento da EAE.

O esquema abaixo ilustra os principais resultados obtidos e também os questionamentos originados pela análise crítica dos mesmos. Esta reflexão determinou

uma nova proposta de investigação cujo objetivo maior é avaliar aspectos que permitam delinear um protocolo de imunização mais adequado para uso humano.

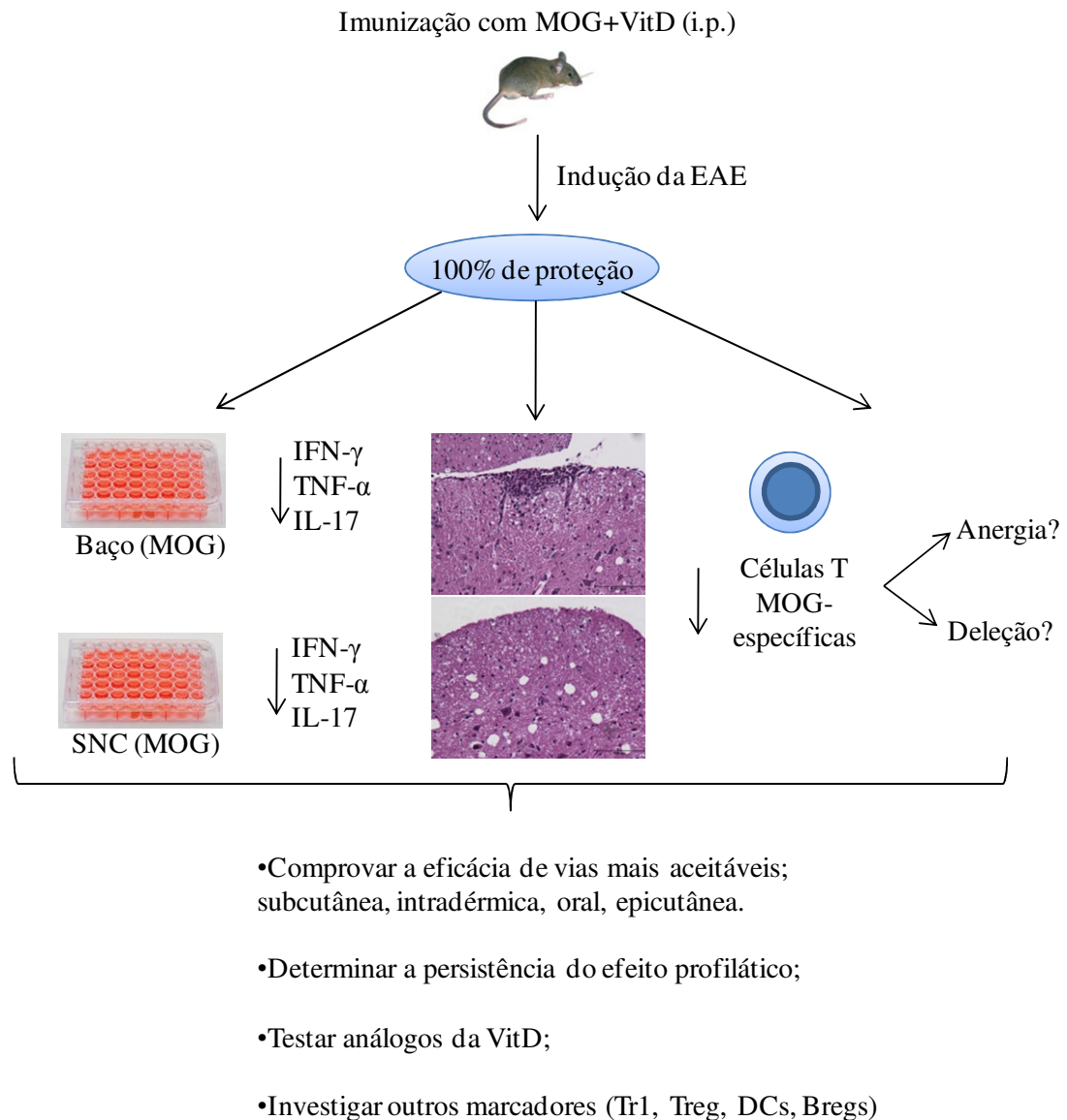


Figura 18. Esquema demonstrando os resultados do efeito da imunização prévia com MOG associada à VitD na EAE e futuras avaliações. Redução de citocinas encefalitogênicas em cultura de baço e células mononucleares do SNC reestimuladas *in vitro* com estímulo específico (MOG). Histopatologia da porção lombar da medula óssea do grupo EAE e M+V/EAE. Diminuição de células mononucleares eluídas do SNC de animais previamente imunizados.

Referências bibliográficas

- Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2004;16:127-34.
- Adorini L, Penna G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Hum Immunol.* 2009; 70:345-52.
- Aharoni R. Immunomodulation neuroprotection and remyelination - the fundamental therapeutic effects of glatiramer acetate: a critical review. *J Autoimmun.* 2014;54:81-92.
- Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, Ciaprin C, Rocchi G, Bergamini A. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in Human Monocytes. *Cytokine.* 2009; 45:190–197.
- Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and Autoimmune Encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int.* 2008;57:115-20.
- Awasthi A, Murugaiyan G, Kuchroo VK. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. *J ClinImmunol.* 2008;28:660-70.
- Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opinion in Pharmacology.* 2010; 10:482–496.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nat rev.* 1998; 392:245-252.
- Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med.* 1997;75:77-88.
- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HFJ, O'Garra A. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4⁺ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *The Journal of Immunology*, 2001;167:4974-4980.
- Carlberg C, Polly P. Gene regulation by vitamin D3. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1998;8(1):19-42.

Chang JH, Cha HR, Lee DS, Seo KY, Kweon MN. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits the Differentiation and Migration of TH17 Cells to Protect against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. PLoS ONE. 2010; 5:e12925.

Chastain EM, Miller SD. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. Immunol Rev. 2012;245:227-38.

Chiuso-Minicucci F, et al. Vitamin D3 and MOG association blocks experimental autoimmune encephalomyelitis development. 2014. Submetido.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet. 2008; 372: 1502–17.

Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). Br J Pharmacol. 2011;164:1079-106.

Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A. Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications. Biochimica et Biophysica Acta. 2011; 1812: 177–183.

Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response-The role of glucocorticoids and Vitamin D. J Steroid BiochemMol Biol. 2010;120:86-95.

Divekar RD, Haymaker CL, Cascio JA, Guloglu BF, Ellis JS, Tartar DM et al. T cell dynamics during induction of tolerance and suppression of experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol. 2011;187:3979-86.

Du T, Zhou ZG, You S, Huang G, Lin J, Yang L, et al. Modulation of monocyte hyperresponsiveness to TLR ligands by 1,25-dihydroxy-vitamin D3 from LADA and T2DM. Diabet Res Clin Pract. 2009;83(2):208-14.

Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGratha JJ. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. J Chemical Neuroanatomy. 2005; 29: 21–30.

Farias AS, Spagnol GS, Bordeaux-Rego P, Oliveira COF, Fontana AGM, de Paula RFO et al. Vitamin D3 Induces IDO+ Tolerogenic DCs and Enhances Treg, Reducing the Severity of EAE. CNS Neurosc Therap. 2013; 19: 269–277 269.

- Filippini G, Del Giovane C, Vacchi L, D'Amico R, Di Pietrantonj C, Beecher D, et al. Immunomodulators and immunosuppressants for multiple sclerosis: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;6.
- Fissolo N, Costa C, Nurtidinov RN, Bustamante MF, Llombart V, Mansilla MJ et al. Treatment with MOG-DNA vaccines induces CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and up-regulates genes with neuroprotective functions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflamm*. 2012; 9:139.
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exper Immunol*. 2010;162:1-11.
- Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*. 2007;6:169-75.
- Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006;129:1953-71.
- Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2002;51:1367-74.
- Haas J, Hug A, Viehover A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2005;35:3343-52.
- Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:24-34.
- Harishankar M, Afsal K, Banurekha VV, Meenakshi N, Selvaraj P. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 downregulates pro-inflammatory cytokine response in pulmonary tuberculosis. *Int Immunopharmacol*. 2014;23:148-152.
- He X, Yan J, Zhu X, Wang Q, Pang W, Qi Z et al. Vitamin d inhibits the occurrence of experimental cerebral malaria in mice by suppressing the host inflammatory response. *J Immunol*. 2014;193:1314-23.

- Hohlfeld R. Multiple sclerosis: Human model for EAE? *Eur J Immunol.* 2009; 39: 1991-2058.
- Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* 2005; 81:45–52.
- Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB J.* 2010; 24:1024-34.
- Huss DJ, Winger RC, Cox GM, Guerau-de-Arellano M, Yang Y, Racke MK, et al. TGF- β signaling via Smad4 drives IL-10 production in effector Th1 cells and reduces T-cell trafficking in EAE. *Eur J Immunol.* 2011;41:2987-96.
- Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, et al. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optico-spinal multiple sclerosis. *Brain.* 2005;128:988-1002.
- Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 2009;183:5458-67.
- Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilken CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998;161:2804-9.
- Kang Y, Xu L, Wang B, Chen A, Zheng G. Cutting Edge: Immunosuppressant as Adjuvant for Tolerogenic Immunization. *The Journal of Immunology.* 2008; 180: 5172–5176.
- Kang Y, Zhao J, Liu Y, Chen A, Zheng G, Yu Y, et al. FK506 as an adjuvant of tolerogenic DNA vaccination for the prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Gene Med.* 2009;11:1064-70.
- Kang Y, Zheng G, Chen A, et al. Tolerogenic DNA vaccine for prevention of autoimmune ovarian disease. *Immunol Invest.* 2012;41:249-60.

Kasper LH, Reder AT. Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014;1:622-31

Kavousanaki M, Makrigiannakis A, Boumpas D, Verginis P. Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum.* 2010;62:53-63.

Khoury SJ, Gallon L, Verburg RR, Chandraker A, Peach R, Linsley PS, Et al. Ex vivo treatment of antigen-presenting cells with CTLA4Ig and encephalitogenic peptide prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Immunol.* 1996;157:3700-5.

Klinkert WE, Kojima K, Lesslauer W, Rinner W, Lassmann H, Wekerle H. TNF-alpha receptor fusion protein prevents experimental auto-immune encephalomyelitis and demyelination in Lewis rats: an overview. *J Neuroimmunol.* 1997;72:163-8.

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006;177:566-73.

Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007;13: 423–431.

Krementsov DN, Teuscher C. Environmental factors acting during development to influence MS risk: insights from animal studies. *Multiple sclerosis.* 2013;19(13):1684-9.

Lemire JM, Archer DC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 1991;87:1103-7.

Levy-Barazany H, Barazany D, Puckett L, Blanga-Kanfi S, Borenstein-Auerbach N, Yang K et al. Brain MRI of nasal MOG therapeutic effect in relapsing-progressive EAE. *Exp Neurol.* 2014 ;255:63-70.

Lin R, Charlesworth J, van der Mei I, Taylor BV. The genetics of multiple sclerosis. *Practical neurology.* 2012;12(5):279-88.

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implication for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;47:707-17.

Mathieu C. Vitamin D and the Immune System: Getting It Right. *IBMS BoneKEy*. 2011;8:178-186.

Mattner F, Smirolto S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL, et al. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol*. 2000; 30:498-508.

McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol*. 2005;175:3025–32.

Menges M, Rössner S, Voigtländer C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*. 2002;195:15-2.

Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature reviews*. 2008; 8: 685-98.

Nygårdas M, Aspelin C, Paavilainen H, Røyttä M, Waris M, Hukkanen V. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice with a replicative HSV-1 vector expressing interleukin-5. *Gene Therapy*. 2011; 18: 646-655.

Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes*, 2000;49:1301-7.

Pedersen AE, Gad M, Kristensen NN, Haase C, Nielsen CH, Claesson MH. Tolerogenic dendritic cells pulsed with enterobacterial extract suppress development of colitis in the severe combined immunodeficiency transfer model. *Immunol*. 2007;121:526–32.

Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for

induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood*. 2005;106:3490-7.

Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, Allavena P, Di Carlo V. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2000;164:4443-51.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005;58:840-6.

Praksova P, Stourac P, Bednarik J, Vlckova E, Mikulkova Z, Michalek J. Immunoregulatory T cells in multiple sclerosis and the effect of interferon beta and glatiramer acetate treatment on T cell subpopulations. *J Neurol Sci*. 2012; 319:18-23.

Ray A, Mann MK, Basu S, Dittel BN. A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2011 ;230:1-9.

Rott, O, Fleischer B, Cash E. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur. J. Immunol*. 1994. 24: 1434–1440.

Rynda-Apple A, Huarte E, Maddaloni M, Callis G, Skyberg JA, Pascual DW. Active immunization using a single dose immunotherapeutic abates established EAE via IL-10 and regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2011;4:313-23.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155:1151-64.

Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2007;165,1097–1109.

Segovia-Gamboa N, Rodríguez-Arellano ME, Rangel-Cruz R, Sánchez-Díaz M, Ramírez-Reyes JC, Faradji R, et al. Tolerogenic dendritic cells induce antigen-specific hyporesponsiveness in insulin- and glutamic acid decarboxylase 65-autoreactive T lymphocytes from type 1 diabetic patients. *Clin Immunol*. 2014; 154:72-83.

- Selvaraj RK, Geiger TL. Induction of Anergy and Infectious Tolerance + Regulatory T Lymphocytes through the Encephalomyelitis by TGF- β Induced Foxp3 Mitigation of Experimental Allergic. *J Immunol*. 2014; 180:2830-2838.
- Sloka S, Silva C, Wang J, Yong VW. Predominance of Th2 polarization by Vitamin D through a STAT6-dependent mechanism. *J Neuroinflamm*. 2011;8:56.
- Smigiel KS, Srivastava S, Stolley JM, Campbell DJ. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunol Rev*. 2014;259: 40–59.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683-747.
- Steinman M, Hemmi H. Dendritic Cells: Translating Innate to Adaptive Immunity R. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006;311:17–58.
- Sun D, Newman TA, Perry VH, Weller RO. Cytokine-induced enhancement of autoimmune inflammation in the brain and spinal cord: implications for multiple sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2004; 30: 374–384.
- Süss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1996;183:1789-96.
- Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, et al. Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2495-503.
- Tang J, Zhou R, Luger D, Zhu W, Silver PB, Grajewski RS, Su SB, Chan CC, Adorini L, Caspi RR. Calcitriol Suppresses Antiretinal Autoimmunity through Inhibitory Effects on the Th17 Effector Response. *J Immunol*. 2009;182:4624-4632.
- Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*. 2004;199:1455-65.

Taub DD. Cytokine, growth factor, and chemokine ligand database. *Curr Protoc Immunol.* 2004;6:6.29.

Thomson AW, Robbins PD. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:90-96.

Torres-Aguilar H, Blank M, Jara LJ, Shoenfeld Y. Tolerogenic dendritic cells in autoimmune diseases: Crucial players in induction and prevention of autoimmunity. *Autoim Rev.* 2010; 10:8–17.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 Production in Central Nervous System Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *Am J Pathol.* 2008; 172: 146-155.

van Brussel I, Lee WP, Rombouts M, Nuyts AH, Heylenc M, De Winter BY, et al. Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: Can the unattainable dream turn into reality? *Autoim Rev.* 2014; 13:138–150.

van Halteren AG, van Etten E, de Jong EC, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes.* 2002;51:2119-25.

Veken K, Hellings N, Hensen K, Rummens J, Medaer R, D'hooghe M, et al. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neuro Res.* 2006; 83:1432-1446.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199:971-9.

Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, Dunn SE, Steinman L, Zamvil SS. Neither T-helper type 2 nor Foxp3+ regulatory T cells are necessary for therapeutic benefit of atorvastatin in treatment of central nervous system autoimmunity. *J Neuroinflam.* 2014; 11:29.

Weir C, Bernard CCA, Backstrom BT. IL-5-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol.* 2003;11:1283-1289.

Wojkowska DW, Szpakowski P, Ksiazek-Winiarek D, Leszczynski M, Glabinski A. Interactions between Neutrophils, Th17 Cells, and Chemokines during the Initiation of Experimental Model of Multiple Sclerosis. *Medi Inflam*. 2014, Article ID 590409.

Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutrition Rev*. 2008;66: 40–46.

World Health Organization [Internet]. Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008. Available from: http://www.who.int/mental_health/neurology/atlas_multiple_sclerosis_resources_2008/en/.

Wu J, Zhou C, Robertson J, Weng CC, Meistrich ML, Taylor RC, et al. Identification of a bone marrow derived CD8 $\alpha\alpha$ + dendritic cell like population in inflamed autoimmune target tissue with capability of inducing T cell apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2010;88:849–861.

Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004;16: 249-256.

Zheng H, Zhang H, Liu F, Qia Y, Jiang H. T cell-depleted splenocytes from mice pre-immunized with neuroantigen in incomplete Freund's adjuvant involved in protection from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Letters*. 2014;157:38– 44.

Zorzella-Pezavento SFG, Guerino CPF, Chiuso-Minicucci F, França TD, Ishikawa LLW, Masson AP, et al. BCG and BCG/DNAhsp65 Vaccinations Promote Protective Effects without Deleterious Consequences for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cli Develop Immunol*. 2013; 1-9.

**Association of myelin oligodendrocyte protein with VitD: a potential vaccine
strategy for multiple sclerosis?**

Luiza Ayumi Nishiyama Mimura¹, Fernanda Chiuso-Minicucci¹, Thais Fernanda de Campos Fraga-Silva¹, Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento¹, Thais Graziela Donegá França¹, Larissa Lumi Watanabe Ishikawa¹, Marcimara Penitenti², Maura Rosane Valerio Ikoma², Alexandrina Sartori¹.

¹ Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, São Paulo, 18618-000, Brazil.

² Laboratório de Citometria de Fluxo – Fundação Dr. Amaral Carvalho, Dona Silvéria Street, 150, Jaú, São Paulo, 17210-070, Brazil.

Correspondence

Alexandrina Sartori, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, São Paulo, 18618-000, Brazil. (e-mail: sartori@ibb.unesp.br). Phone: +55 14 38800414.

Abstract

Multiple sclerosis is a chronic, inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). As there is no cure for this disease, new prophylactic or therapeutic strategies are necessary. The main objective of this work was to evaluate the prophylactic potential of the association of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) with vitamin D3 in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). C57BL/6 mice were immunized with MOG associated with vitamin D3 and then submitted to EAE induction. Animals were euthanized 7 and 19 days after, during the preclinical and acute disease phases, respectively. The following parameters were evaluated: body weight, clinical score, inflammatory process in the CNS, amount of dendritic and regulatory T cells in the spleen and cytokine production by spleen and CNS cell cultures. Immunization with MOG associated with vitamin D3 blocked clinical EAE development. This prophylactic effect was associated with a drastic reduction in clinical score, body weight loss, CNS inflammation, dendritic cells maturation and also in the production of cytokines by central nervous system and spleen cell cultures. This association was highly tolerogenic, being able to avoid EAE development. A similar effect from vitamin D3 associated with other specific self-antigens is expected in other autoimmune conditions and deserves future evaluation.

Keywords

Multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; vitamin D3; myelin oligodendrocyte glycoprotein; tolerogenic adjuvant.

Abbreviations

ANOVA: analysis of variance; CFA: Complete Freund's Adjuvant; ConA: concanavalin A; CNS: central nervous system; DCs: dendritic cells; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis; Foxp3: forkhead box P3; IFN- γ : Interferon gamma; IL: interleukin; MS: multiple sclerosis; MHC-II: Major histocompatibility complex class II; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; NOD: non-obese diabetic mice; OVA: ovalbumin peptide; PLGA: polymeric biodegradable lactic-glycolic acid; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; Treg: regulatory T cell; VitD: 1 α ,25 dihydroxyvitamin D3.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) affecting mainly young people (Ellwardt and Zipp, 2014). According to the World Health Organization the disease affects more than two million people worldwide being estimated around 30 cases per 100,000 (WHO, 2008). Although the etiology and immunopathogenesis of the disease are still not entirely elucidated, it is believed that this pathology is mainly mediated by Th1 and Th17 subsets (Sospedra and Martin, 2005; Luchtman et al., 2014). Cytokines such as IFN- γ , TNF- α and IL-17, produced by these T cell subsets, mediate inflammation and subsequent axonal degeneration, oligodendrocyte death and neuronal dysfunction (Sospedra and Martin, 2005; Lucchinetti et al., 2000; Furuzawa-Carballeda et al., 2007). Defects in the functional activity of regulatory T cells (CD4+CD25+) have also been associated with MS (Viglietta et al., 2004). Genetic predisposition and environmental factors also contribute to MS initiation and development (Lin et al., 2012; Kremensov and Teuscher, 2013).

Animal models, particularly experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) have been extensively used to elucidate the pathophysiology and the potential therapeutic measures for MS (Zorzella-Pezavento et al., 2014; França et al., 2014; Ben-Num et al., 2014). Current therapeutic approaches to control the destructive immune response in autoimmune disease are mainly based on non-specific drugs that systemically suppress the function of many immune effectors cells. This extensive immunosuppression often causes serious and sometimes life-threatening side effects (Damal et al., 2013). Therefore, the need for more specific treatments resulting in lower toxicity and longer-term solutions is obvious. Tolerogenic vaccines comprise a new class of vaccines, designed to re-establish immunological tolerance and thereby theoretically able to reverse autoimmune diseases. Substantial advances have been achieved in the generation of tolerogenic vaccines that inhibit EAE in a preclinical setting. Some of the most relevant and recent findings in this context include dendritic cell vaccines (van Brussel et al., 2014), MOG-DNA constructions (Fissolo et al., 2012), cytokine-neuroantigen fusion proteins (Mannie et al., 2012) and PLGA particles loaded with MOG plus IL-10 (Cappellano et al., 2014).

An alternative and more straightforward approach could be based on the concept of tolerogenic adjuvants. In contrast to the conventional immunogenic adjuvants that intensify the immune response, the called tolerogenic adjuvants have the ability to suppress the specific immune response when associated with specific antigens. This concept and its functional application to induce T cell tolerance in autoimmune disease was conceived by *Kang et al.* (2008). These authors demonstrated that dexamethasone associated with an insulin peptide and FK506 associated with MOG were prophylactic in diabetes and encephalomyelitis, respectively (Kang et al., 2008; Kang et al., 2009). In this context, we hypothesized that vitamin D3 (VitD) could also behave as a tolerogenic adjuvant if associated with a specific antigen. This possibility was raised by the strong evidences that VitD is able to modulate the immune response at both, innate and adaptive levels. For example, VitD is capable to promote antimicrobial response by macrophages through the induction of antibacterial proteins (Wang et al., 2004). On the other hand, it suppresses inflammation and promotes immune tolerance by affecting antigen presentation and T cell proliferation and differentiation (Chun et al., 2014).

Therefore, in the present study we evaluated the prophylactic effect of the immunization with MOG, in the presence of VitD, in EAE development. This procedure completely blocked disease development being associated with reduction in DC maturation, number of Foxp3+ regulatory T cells and proinflammatory cytokine production by spleen and CNS cell cultures. Increased production of TGF- β was observed in the periphery and also in the CNS of vaccinated mice.

Materials and methods

Animals

Female C57BL/6 mice with 6-7 weeks old were purchased from University of São Paulo (USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The animals were carried out in accordance with the Ethics Committee for Animal Experimentation - Biosciences Institute, Univ. Estadual Paulista (protocol 571).

Immunization with MOG in the presence of VitD

Mice were inoculated with 0,1 μ g of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (VitD) from Sigma, every other day during 15 days (on days 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 and 15), according to *Lemire & Archer (1991)*. MOG₃₅₋₅₅ (150 μ g) was co-administered on days 3 and 11.

EAE induction

Previously immunized mice were subcutaneously injected with 150 μg of MOG₃₅₋₅₅ peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) synthesized by Genemed Synthesis Inc. (San Antonio, Texas, USA) emulsified with Complete Freund's Adjuvant (ACF) containing 4 mg/mL of *Mycobacterium tuberculosis*. Mice also received 2 intraperitoneal doses, 0 and 48 h after immunization, of 250 ng of *Bordetella pertussis* toxin (Sigma). EAE clinical score was daily assessed according to the following criteria: 0 - no disease, 1 - limp tail, 2 - weak/partially paralyzed hind legs, 3 - completely paralyzed hind legs, 4 - complete hind and partial front leg paralysis, and 5 - complete paralysis/death.

CNS cells isolation

Nineteen days after EAE induction, mice were anesthetized with ketamine/xylazine and perfused with 10 mL of saline solution. Brain and spinal cord were collected and digested with collagenase D (2.5 mg/mL, Roche) in 4 mL of RPMI (Sigma) at 37°C for 45 min. Then, suspensions were washed in RPMI and centrifuged at 450 $\times g$ for 15 min at 4°C. Cells were resuspended in percoll (GE Healthcare) 37% and gently laid over percoll 70% in tubes of 15 mL. The tubes were centrifuged at 950 $\times g$ for 20 min with centrifuge breaks turned off. After centrifugation the ring containing mononuclear cells was collected, washed in RPMI, and centrifuged at 450 $\times g$ for 10 min. Cells were then resuspended in complete RPMI medium, counted, and analyzed.

Cell culture conditions and cytokine quantification

Spleen and CNS-isolated cells were collected and adjusted to 5×10^6 cells/mL, and 2.0×10^5 cells/mL, respectively. Cells were cultured in complete RPMI medium (RPMI supplemented with 10% of fetal calf serum and 2 mM of glutamine). Spleen and CNS-isolated cells were restimulated *in vitro* with Con A or MOG (20 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Cytokine levels were evaluated 48h later by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in culture supernatants using IFN- γ , TGF- β and IL-10 BD OptEIA Sets (Becton Dickinson) and IL-6 TNF- α and IL-17 Duosets (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The assays were performed according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry

Spleen cells were collected and the red blood cells were lysed with buffer containing NH_4Cl . For regulatory T cells analysis, cells were incubated with 0.5 μg of FITC labeled anti-mouse CD4 (clone GK1.5) and 0.25 μg of APC labeled anti-mouse CD25 (clone PC61.5) (eBiosciences, San Diego, CA, USA) for 20 min at room temperature. Intracellular Foxp3 transcription factor was detected using Foxp3 PE Staining Set (eBiosciences) according to manufacturer's instructions. For dendritic cells (DCs) analysis, splenic cells were incubated with 0.25 μg of FITC labeled anti-mouse CD11c (clone N418), 0.03 μg of APC labeled anti-mouse MHCII (clone M5/114.15.2) and 0.125 μg of PE labeled anti-mouse CD86 (clone GL1) (eBiosciences) for 30 min at 4°C. After incubation, the cells were washed, resuspended in flow cytometry buffer and fixed in paraformaldehyde 1%. The cells were analyzed by flow cytometry using the FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA). Regulatory T cells and DCs analyses were performed by FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, EUA) and Infinicyt software (Cytognos, Salamanca, Spain), respectively.

Evaluation of inflammatory infiltrates in the CNS

The histological analysis was performed during EAE acute phase (19 days after EAE induction). After euthanasia, brain and lumbar spinal cord samples were fixed in 10% formaldehyde. Paraffin slides (5 μm) were stained with hematoxylin & eosin and analyzed with a Nikon microscope.

Calcium level

The serum calcium level was analyzed using Cálcio Arsenazo III commercial kit (Bioclin, Minas Gerais, Brazil), according to the manufacturer's instruction.

Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation or with median and interquartile (25-75%) ranges. Comparisons between two samples were made by t test and more than two samples were made by one way ANOVA followed by Tukey's test for parametric variables and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for non-parametric variables. Chi-square was performed for EAE incidence. Statistical analysis

was accomplished with SigmaPlot software version 12.0 (Jandel Corporation, USA) and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Modulatory effect of VitD was not altered by the presence of MOG

Eight doses of VitD, administered every other day, clearly down-modulated TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-17 production by splenic cells stimulated with Con A as demonstrated in Fig. 1A, 1B, 1C and 1D, respectively. A discrete downmodulatory effect in the amount of CD11c+CD86+MHCII+ DCs in the spleen was also elicited by VitD inoculation (Fig. 1E). On the other hand, mice injected with VitD presented a slightly higher number of CD4+CD25+Foxp3+ T cells (Fig. 1F) in the spleen. Body weight and calcium levels were also affected by VitD administration. These animals presented significant hypercalcemia and accentuated body weight loss. MOG inoculation did not affect these parameters neither reverted or changed VitD immunomodulatory effects.

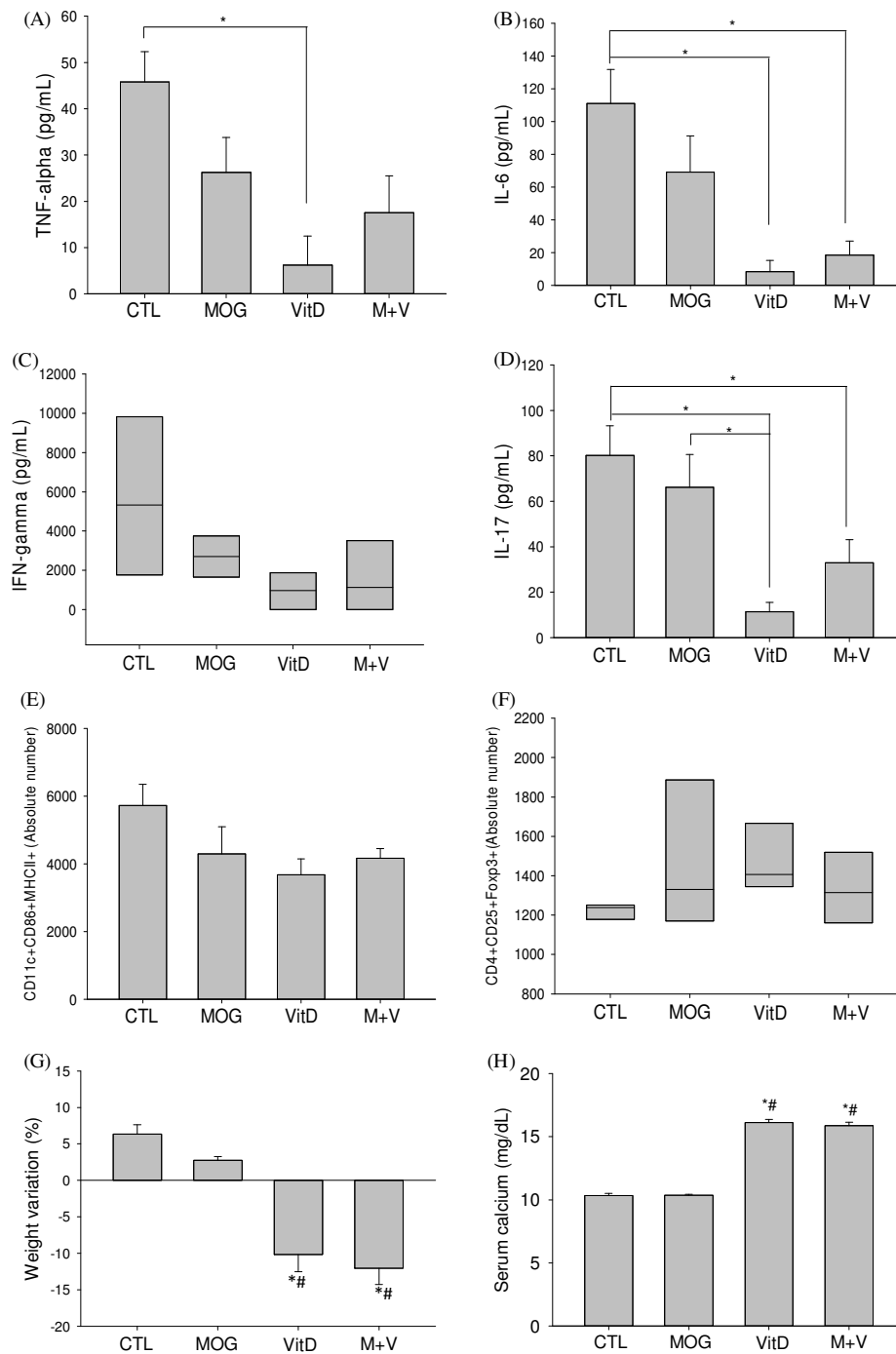


Figure 1. Immunomodulatory effect of MOG+VitD association in C57BL/6 mice. TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C) and IL-17 (D) levels were measured in spleen cell cultures stimulated with Con A. Absolute number of CD11c+CD86+MHCII+ DCs (E) in 500.000 acquired events and CD4+CD25+Foxp3+ Tregs in total CD4+ cell (F) in 100.000 acquired events. Weight variation (G) and serum calcium level (H). Comparisons among groups were made by one way ANOVA followed by Tukey's test for parametric variables and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for non-parametric variables. Results were expressed as mean or medians (25-75% ranges) of 5-6 animals per group. *p < 0.05.

Association of MOG with VitD was highly prophylactic

To test the prophylactic potential of MOG+VitD association, C57BL/6 mice were immunized with MOG in the presence of VitD and then subjected to EAE induction. Disease incidence is shown in Table 1. The incidence in the positive control group reached 85,71%.

Table 1. EAE incidence after MOG+VitD immunization.

Groups	Incidence (%)	p
EAE	85.71	0.007
MOG/EAE	60	
VitD/EAE	83.33	
M+V/EAE	0	

These animals presented the expected clinical signals as paralysis and accentuated body weight loss, as shown in Fig. 2. Previous immunization with the MOG+VitD association triggered a clear protection. This group presented no signs of disease as paralysis or body weight loss, as illustrated in Fig. 2A and 2B, respectively. Differently from this protective effect, VitD or MOG alone only slightly delayed clinical disease manifestations (Fig. 2A) and did not affect the maximum clinical score (Fig. 2B) or the body weight loss (Fig. 2C).

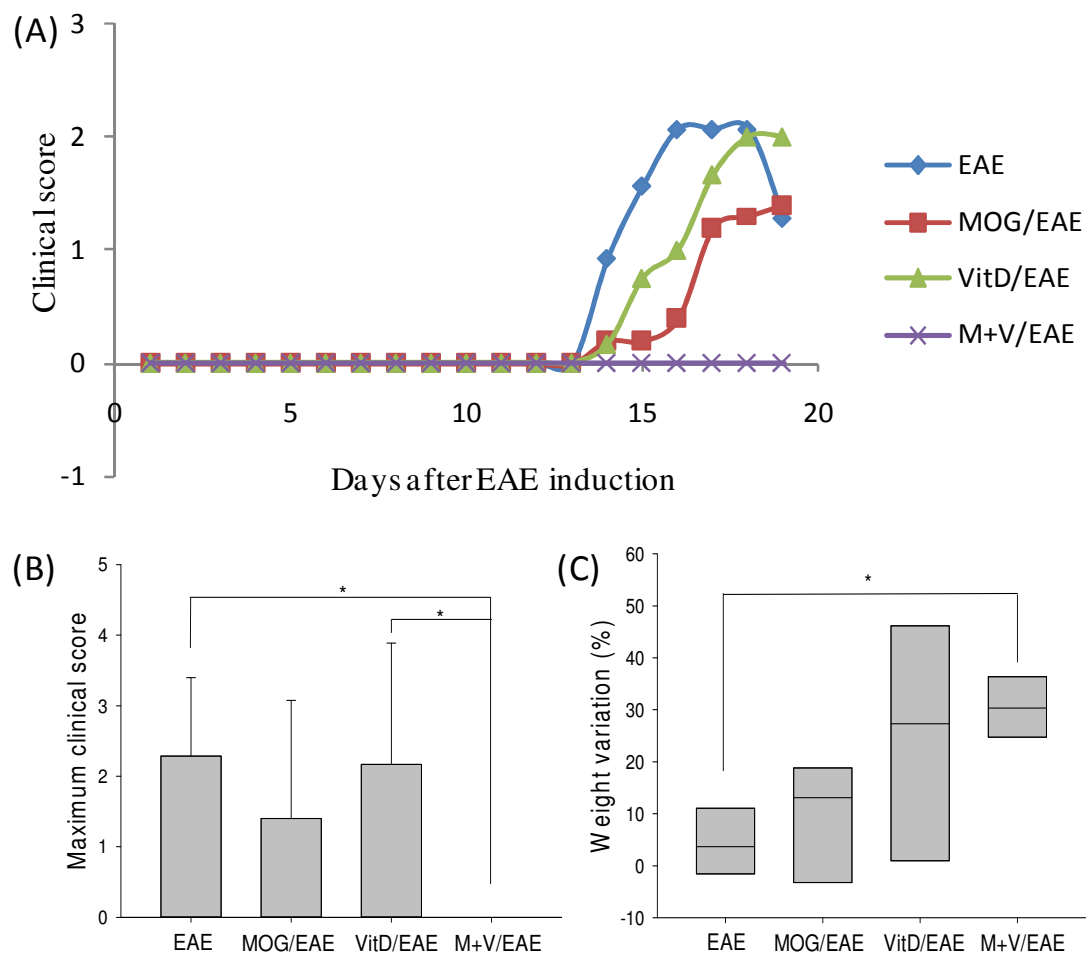


Figure 2. Effect of previous immunization with MOG associated with VitD in EAE clinical development. Kinetics of clinical scores (A), maximum clinical score (B) and body weight variation (C). Comparisons among groups were made by one way ANOVA followed by Tukey's test for parametric variables and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for non-parametric variables. Results were expressed as mean or medians (25-75% ranges) of 5-7 animals per group. * $p < 0.05$. Data are representative of two independent experiments.

These findings were reinforced by the histopathological analysis. As illustrated in Fig. 3, lumbar spinal cord samples from the positive control group (EAE) (Fig. 3B) presented the expected inflammatory foci concentrated in the tissue periphery. Similar inflammatory infiltrates were observed in samples obtained from MOG/EAE (Fig. 3C) and VitD/EAE (Fig. 3D) groups. Otherwise, no inflammatory infiltrates were detected in spinal cord samples from mice previously immunized with MOG associated with VitD (Fig. 3E).

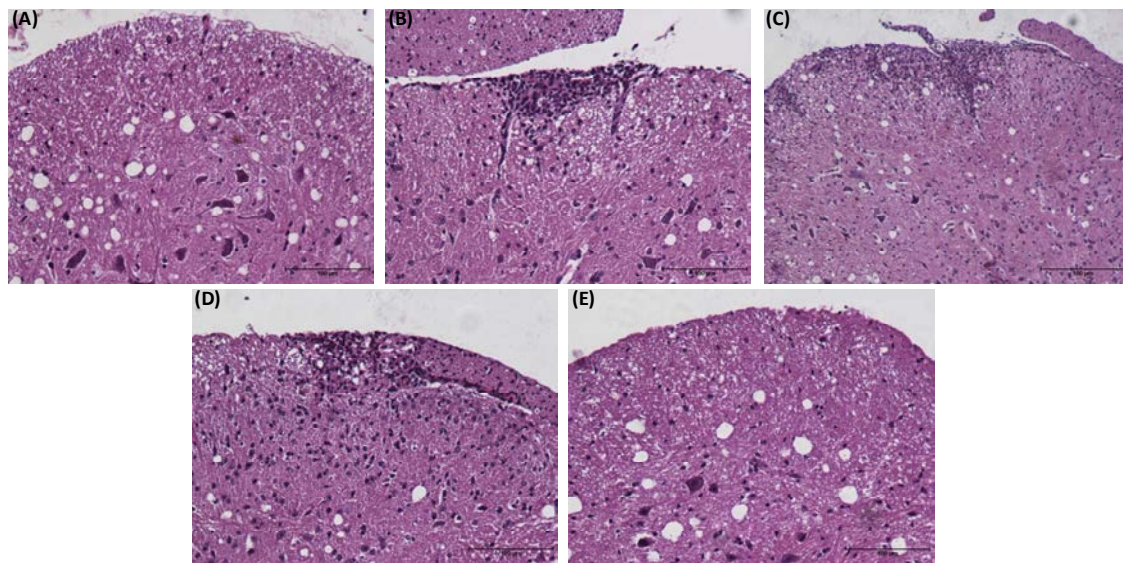


Figure 3. Inflammatory process in the lumbar spinal cord of C57BL/6 mice immunized with MOG+VitD before EAE induction. Inflammatory infiltrates were analyzed during the acute phase in Control (A), EAE (B), MOG/EAE (C), VitD/EAE (D) and M+V/EAE (E) samples. Scale bar =100 μ m. Micrographs are representative of 5 animals per group.

MOG+VitD specific modulatory effect

The modulatory effect of MOG+VitD previous immunization was evaluated 7 and 19 days after EAE induction, that is, during the preclinical and clinical disease phases, respectively. A very clear downmodulatory activity was observed in the preclinical phase. Splenic cell cultures stimulated with MOG produced significantly lower amounts of the encephalitogenic cytokines TNF- α (Fig. 4A), IFN- γ (Fig. 4C) and IL-17 (Fig. 4D). At this early phase no differences were observed in the production of TGF- β and IL-10 by EAE and M+V/EAE groups, as illustrated in Fig. 4E and 4F, respectively. Preimmunized animals also presented significantly lower numbers of CD11+CD86+MHCII+ DCs and CD4+CD25+Foxp3+ cells in the spleen as depicted in Fig. 4G and 4H, respectively.

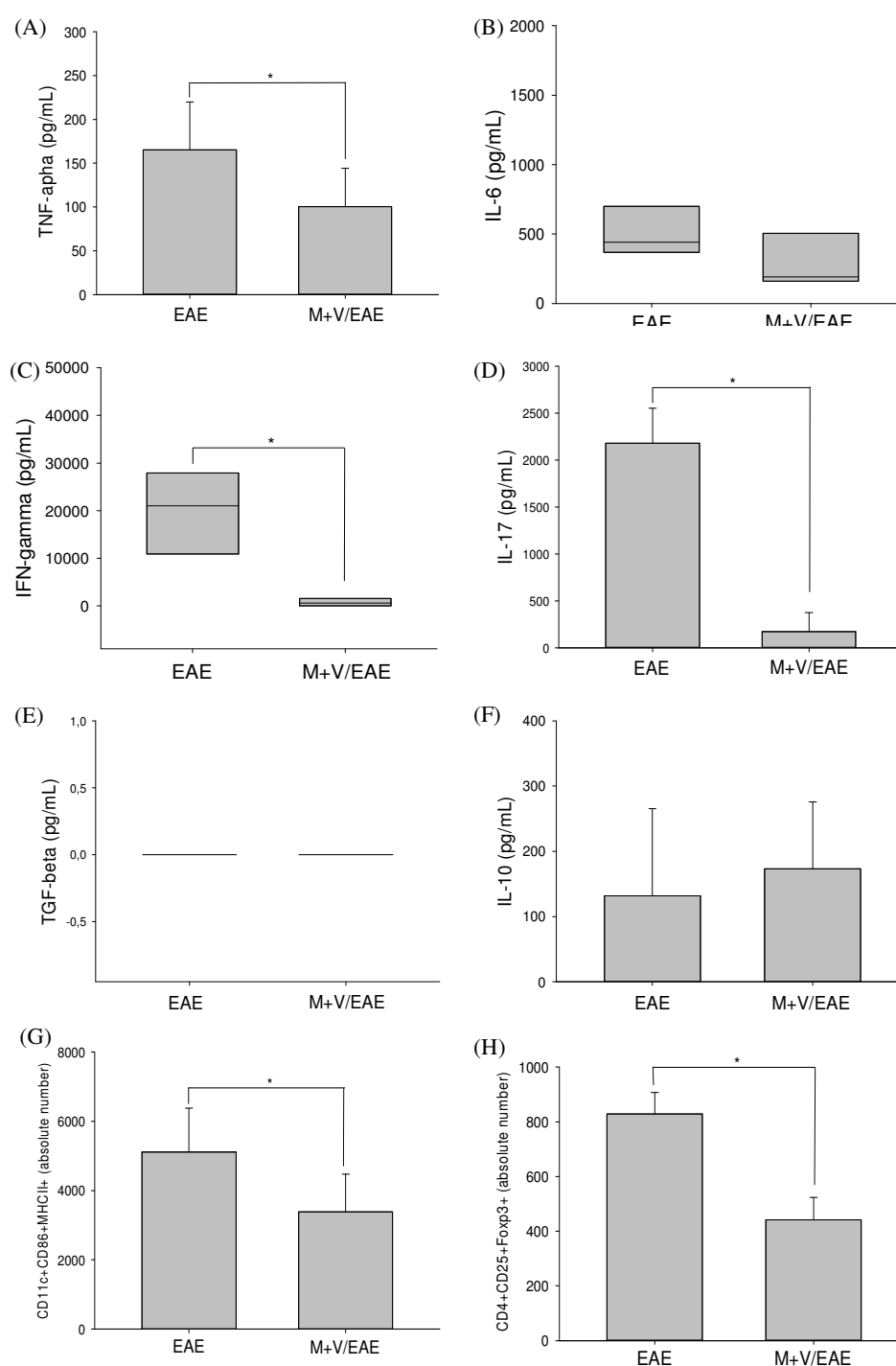


Figure 4. Effect of MOG+VitD immunization before EAE induction in the immune response analyzed during the preclinical phase. TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), TGF- β (E) and IL-10 (F) levels were measured in spleen cell culture stimulated with MOG. Absolute number of CD11c+CD86+MHCII+ DCs (G) in 500.000 acquired events and CD4+CD25+Foxp3+ Tregs in total CD4+ cell (H) in 100.000 acquired events. Comparisons between groups were performed by t-test. Data were presented by mean $\pm$ SE or medians (25-75% ranges) of 6 animals per group. *p < 0.05.

The production of TNF- α (Fig. 5A), IL-6 (Fig. 5B), IFN- γ (Fig. 5C) and IL-17 (Fig. 5D) remained significantly lower in the MOG+VitD immunized group during the acute disease phase. However, other parameters were clearly distinct from the ones observed in the previous phase. This was the case of TGF- β (Fig. 5E) whose production was significantly higher in the previously immunized group and IL-10 (Fig. 5F) whose production was decreased in the immunized group. Interestingly, there was an increased number of mature DCs in this group even though the number of CD4+CD25+Foxp3+ cells was similar in both groups, as showed in Fig. 5G and 5H, respectively.

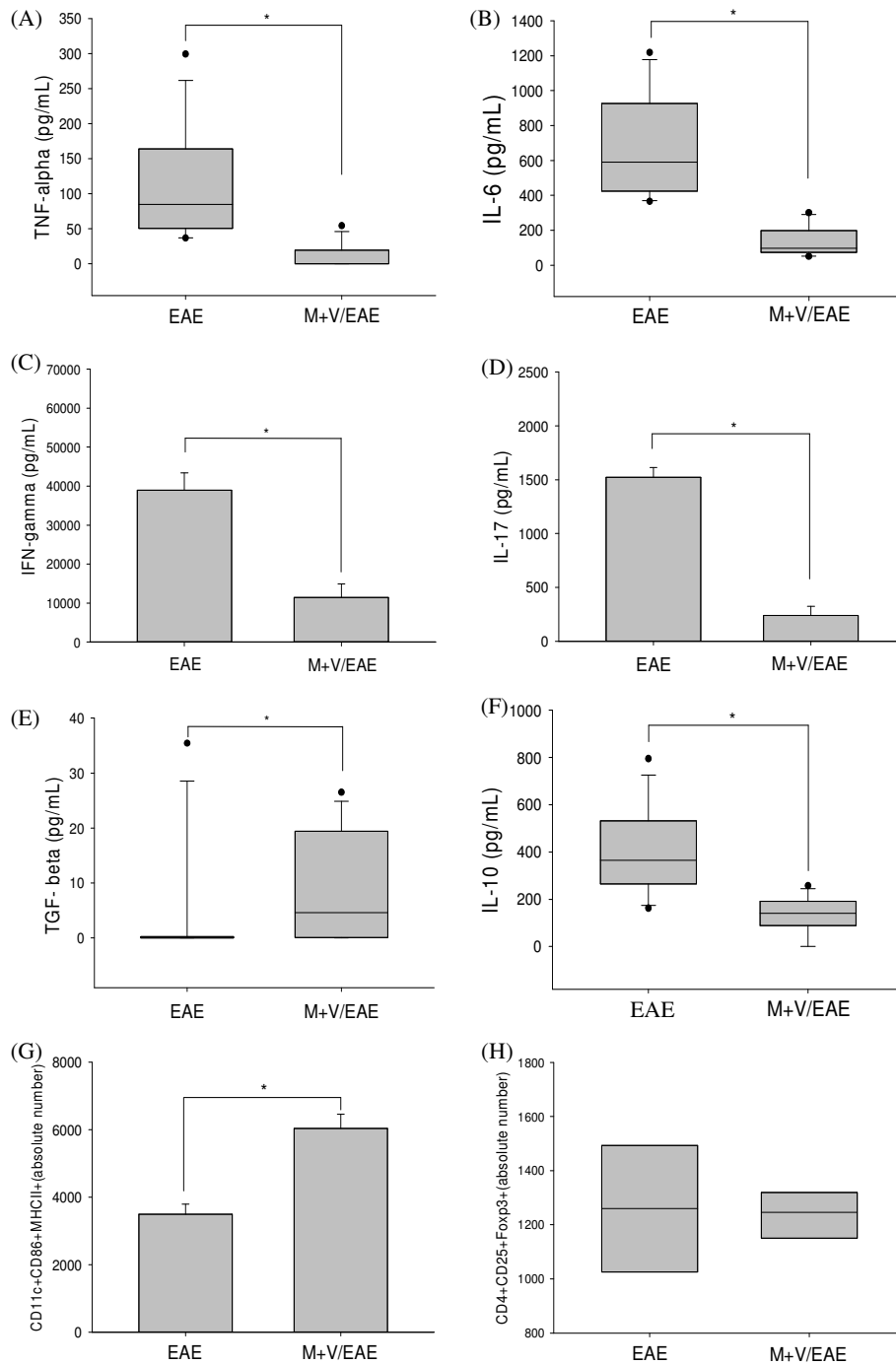


Figure 5. Effect of MOG+VitD immunization before EAE induction in the immune response analyzed during the acute phase. TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), TGF- β (E) and IL-10 (F) levels were measured in spleen cell culture stimulated with MOG. Absolute number of CD11c+CD86+MHCII+ DCs (G) in 500.000 acquired events and CD4+CD25+Foxp3+ Tregs in total CD4+ cell (H) in 100.000 acquired events. Comparisons between groups were performed by t-test. Data were presented by mean $\pm$ SE or medians (25-75% ranges) of 12 animals per group. *p < 0.05. Data are representative of two independent experiments.

Changes in the CNS

Brain histological analyses confirmed the spinal cord findings, that is, typical inflammatory foci, with a mononuclear predominance, were detected in the EAE control group (Fig. 6A), whereas no inflammatory infiltrates were found in previously immunized mice (Fig. 6B). However, enough cells were recovered from the CNS of previously immunized mice to allow their *in vitro* restimulation with MOG. Comparison of cell numbers eluted from the CNS of both experimental groups is showed in figure 6C. TNF- α (Fig. 6D), IL-6 (Fig. 6E), IFN- γ (Fig. 6F), IL-17 (Fig. 6G) and IL-10 (Fig. 6H) production was significantly down-regulated in the previously immunized group. On the other hand, a high level of TGF- β was observed in the immunized group (Fig. 6I).

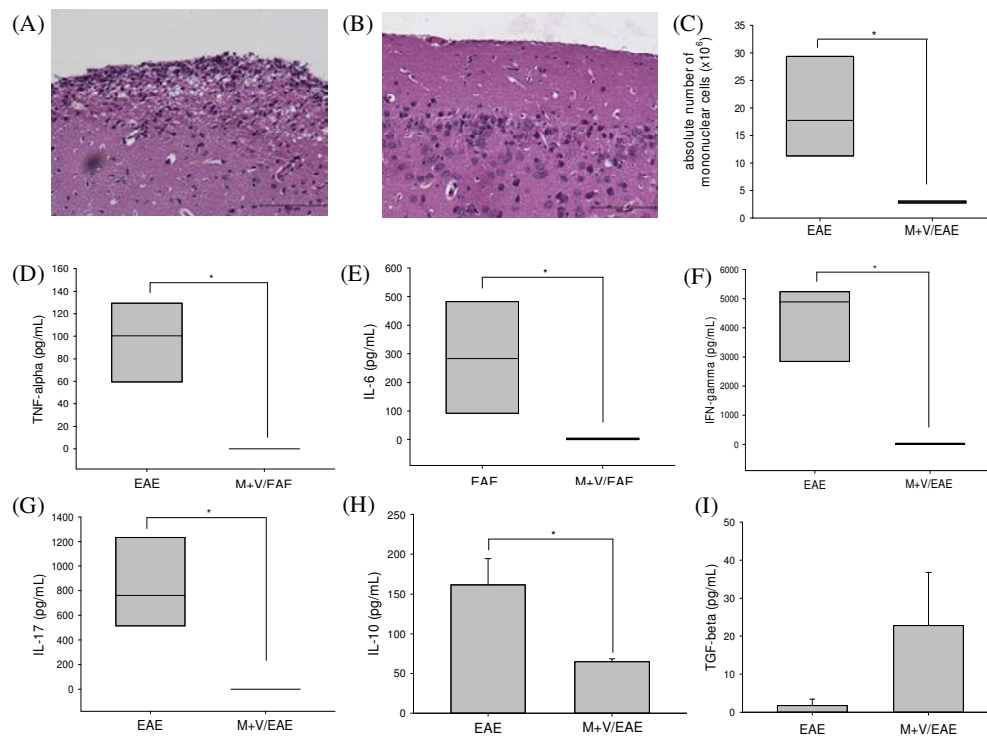


Figure 6. Effect of previous immunization with MOG associated with VitD in the CNS. Brain histopathology in EAE sample (A) and M+V/EAE samples (B). Number of mononuclear cells eluted from the CNS (C). TNF- α (D), IL-6 (E), IFN- γ (F), IL-17 (G) and IL-10 (H), TGF- β (I) levels were measured in CNS cell cultures stimulated with MOG. Comparisons between groups were performed by t-test. Data were presented by mean $\pm$ SE or medians (25-75% ranges) of 4 pools (each pool containing brains and spinal cords from 3 animals) per group in CNS cultures. * p < 0.05. . Scale bar = 100 μ m. Data are representative of two independent experiments.

Discussion

Most of the available drugs employed to control MS down-modulate the immune system. As they are not selective for autoreactive T cells they compromise the immune system's ability to fight against infectious disease. The ideal measure to control MS seems to be a strategy that selectively restores self-tolerance to CNS antigens leaving intact the ability to control infectious agents. The concept of inverse vaccination coined by *Steinman* (2010) and of tolerogenic adjuvants suggested by *Kang et al.* (2009) seems to fit perfectly to attain this goal. The main objective of this work was to evaluate if the immunization with MOG in the presence of VitD could be prophylactic in the EAE model. We initially evaluated the immunomodulatory effect of MOG, VitD and the association of MOG+VitD in C57BL/6 mice that is a widely accepted strain to induce EAE. VitD was administered every other day during two weeks and MOG was co-administered with VitD at the 3rd and 11th days. This procedure did not significantly affect the number of regulatory T cells but it slightly decreased the amount of mature DCs. It also decreased the production of encephalitogenic cytokines, being this effect highly significant in the case of IFN- γ , IL-6 and IL-17. Similar immunomodulatory effects have been attributed to VitD in C57BL/6 and other mice strains (*Chang et al.*, 2010; *Joshi et al.*, 2011). As most of VitD effect was kept when MOG was included in the procedure, we asked if this effect would be strong enough to determine a prophylactic effect in EAE. Previous immunization with MOG+VitD association was highly protective and this experimental group presented no clinical disease manifestations, that is, no body weight loss neither any sign of paralysis. MOG triggered a discrete protective effect characterized by a lower disease incidence and also a delayed paralysis appearance. VitD alone was not protective. The histopathological analysis of the CNS confirmed these findings showing no inflammatory infiltrates in the previously immunized group. To the best of our knowledge, this is the first demonstration that MOG+VitD association can determine such a strong prophylactic activity in a MS experimental model. The idea to employ purified antigens to induce specific tolerance in this or other autoimmune diseases is not new. A plethora of strategies employing MOG have been devised, tested and showed promising results. *Levy-Barazany et al.* (2014) described reduction in both, clinical score and CNS inflammation in NOD mice after nasal administration of MOG. It was also effective

when delivered as a genetic vaccine (Fissolo et al., 2012) or as a portion of a fusion protein (Divekar et al., 2011). However, the use of VitD as a tolerogenic adjuvant when associated with a specific antigen is a new proposition in the autoimmunity field.

To get some insight into the immunological mechanism involved in this prophylactic effect, we evaluated the parameters that are most usually affected by tolerogenic strategies, that is, cytokines, DCs and regulatory T cells. These analyses were done during the preclinical and clinical EAE phases, which occurred 7 and 19 days after EAE induction, respectively. A protective effect was already detected at the preclinical phase. By this time the animals were already producing smaller amounts of encephalitogenic cytokines upon *in vitro* stimulation with MOG. The similar production of IL-10 and the absence of TGF- β production by both groups, suggest that the lower levels of the encephalitogenic cytokines in the protected group were not due to an increased production of anti-inflammatory cytokines. Interestingly, the immunized group presented a smaller amount of mature (CD11c+CD86+MHCII+) DCs than the positive control group. As it is well established that mature DCs are fundamental to promote a strong and effective immune response (Guermonprez et al., 2002), the smaller amount of mature DCs in the spleen of previously immunized mice could explain the weak immune response against MOG. This finding is especially relevant because DCs have been pointed as a critical and promising target in the immunomodulatory strategies devised to control autoimmune mediated diseases (Segovia-Gamboa et al., 2014; Kavousanaki et al., 2010). Considering that MOG by itself was not able to significantly decrease DCs maturation, the observed downmodulatory effect is probably associated with VitD. This possibility is highly supported by the literature in infection and even in EAE model. For example, C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA were treated with VitD before and after infection. VitD treatment resulted in both, inhibition of DCs maturation and less cellular migration to the brain (He et al., 2014). Also, the adoptive transference of VitD induced tolerogenic DCs to Lewis rats before EAE induction resulted in a less severe disease (Farias et al., 2013).

The concept that CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells are deeply involved in the control of infectious and autoimmune inflammatory processes is strongly supported by the literature (Smigiel et al., 2014; Harishankar et al., 2014). In addition, most of the

therapeutical procedures involving the application of VitD, promoted an increased frequency of this type of regulatory T cell (Takeda et al., 2010; Jeffery et al., 2009). For these reasons an increased number of CD4+CD25+Foxp3+ T cells was expected in the group previously immunized with MOG+VitD. However, the number of these cells was significantly lower in this experimental group during the preclinical disease phase. Our interpretation of this data is that a reduced inflammatory process would not trigger Treg expansion. This possibility finds support in the literature. For example, the maturation of DCs is considered essential for the immunogenic presentation and subsequent migration of T cell subsets to inflammatory sites (Steinman and Hemmi, 2006). It is also described that specific regulatory T cells undergo expansion in sites with proinflammatory cytokines (Korn et al., 2007). This reduced expansion of encephalitogenic T cells without a concomitant increase in the number of Treg cells was recently associated with the therapeutical effect of atorvastatin in an MS experimental model (Weber et al., 2014). Interestingly, human Treg cells also suppress VitD receptor and higher levels of this vitamin were associated with reduction in the number and in the proliferative ability of this T cell subset (Khoo et al., 2011). In this scenario, we believe that most of the prophylactic effect prompted by MOG+VitD immunization was triggered by these immature DCs. One of the most useful aspects of our work is the potential to be translated from bench to bed. Predominant investigations in this area demonstrated that VitD hindered DCs differentiation *in vitro* (Farias et al., 2013; He et al., 2014; Ferreira et al., 2014). Our findings indicate that a similar effect can be triggered by *in vivo* injection of VitD. The induction of anergy or apoptosis of antigen-specific T cells, as described in the literature, could determine this tolerogenic phenomenon (Banica et al., 2014; Wu et al., 2010) and deserves further investigation.

The lower production of pro-inflammatory cytokines in vaccinated mice was also observed later, during the acute disease phase. However, a clear change was detected in the profile of TGF- β and IL-10 production. Previously immunized mice produced less IL-10 but higher TGF- β levels than the EAE control group. The number of cells eluted from the CNS of previously immunized mice was strikingly smaller, confirming, therefore, the histopathological analysis that showed no inflammatory infiltrates in the CNS of this experimental group. In addition, these cells produced TGF- β and IL-10 but not encephalitogenic cytokines in response to MOG. This finding

strongly suggests that the MOG+VitD prophylactic effect is associated with the generation and posterior infiltration of anti-inflammatory cytokine producer T cells, mainly IL-10 and TGF- β , to the CNS. In spite of the controversial role of TGF- β in pathological conditions (Han et al., 2012), a similar beneficial role has been attributed to these cytokines in other therapeutical scenarios. For example, *Taher et al.* (2008) demonstrated that these cytokines played a critical role in the beneficial effects of combined immunotherapy with allergen plus VitD in a mouse model of allergic asthma. *Spach et al.* (2006) described that IL-10 signaling is essential for VitD mediated inhibition of EAE. Also, patients with MS that received VitD showed significantly higher levels of these cytokines compared with the control group (Mosayebi et al., 2011).

The most promising aspect raised by these findings is to reveal that antigen/tolerogenic adjuvant combinations can be highly prophylactic and possibly therapeutical in autoimmune diseases. Concerning MS, further preclinical investigations including tests with VitD analogs devoid of side effects (Leyssens et al., 2014) and more acceptable routes for self-antigen administration, as the transdermal ones (Majewska et al., 2007) are waiting for further evaluation.

We believe that this protective effect depends upon the concomitant presence of both, MOG and VitD, because these substances, isolatedly, were not able to induce a significant protective effect. These results also suggest that VitD is working as a tolerogenic adjuvant. The possible role of immunosuppressive drugs as tolerogenic adjuvants was only recently reported. *Kang et al.* (2008), for example, demonstrated that OVA sensitized BALB/c mice could be desensitized by a concomitant treatment with an OVA peptide plus dexametasone. Blockage on DCs maturation and expansion of regulatory Foxp3+ Treg cells were associated with this tolerogenic activity. These authors also showed that dexametasone could be tolerogenic and prophylactic in NOD diabetes when associated with an insulin peptide. This concept also worked in EAE. The authors prevented EAE development by immunizing mice with a MOG DNA vaccine in the presence of FK506 (Kang et al., 2009).

Conclusion

Altogether, these findings indicate, for the first time, that VitD can be used as a tolerogenic adjuvant. Association of MOG with VitD significantly down-modulated the specific immune response and completely blocked EAE development.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding source

The authors wish to thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for the financial support and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the Mimura LAN scholarship. The funding sources had no involvement in the conduct of the research and/or preparation of this article.

Acknowledgements

LANM, FCM and AS: were the main investigators of this study. TFCFS: contributed to the experiments and processed the CNS samples for histological analyses. SFZP, TGDF and LLWI: contributed with the experiments. MP and MRVI: performed cytometric analyses. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Banica L.M., Besliu A.N., Pistol G.C., Stavaru C., Vlad V., Predeteanu D., Ionescu R., Stefanescu M., et al., 2014. Dysregulation of anergy-related factors involved in regulatory T cells defects in Systemic Lupus Erythematosus patients: Rapamycin and Vitamin D efficacy in restoring regulatory T cells. *Int. J. Rheum.*, Epub ahead of print.
- Ben-Nun A., Kaushansky N., Kawakami N., Krishnamoorthy G., Berer K., Liblau R., Hohlfeld R., Wekerle H., 2014. From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: Impact on understanding pathogenesis and drug development. *J. Autoimmun.* 54, 33-50.
- Cappellano G., Woldetsadik A.D., Orilieri E., Shivakumar Y., Rizzi M., Carniato F., Gigliotti C.L., Boggio E., et al., 2014. Subcutaneous inverse vaccination with PLGA

particles loaded with a MOG peptide and IL-10 decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vaccine*. 32, 5681-5689.

Chang J.H., Cha H.R., Lee D.S., Seo K.Y., Kweon M.N., 2010. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 5, e12925.

Chun R.F., Liu P.T., Modlin R.L., Adams J.S., Hewison M., 2014. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front. Physiol.* 5, 151.

Damal K., Stoker E., Foley J.F., 2013. Optimizing therapeutics in the management of patients with multiple sclerosis: a review of drug efficacy, dosing, and mechanisms of action. *Biologics*. 7, 247–258.

Divekar R.D., Haymaker C.L., Cascio J.A., Guloglu B.F., Ellis J.S., Tartar D.M., Hoeman C.M., Franklin C.L., et al., 2011. T cell dynamics during induction of tolerance and suppression of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 187, 3979-3986.

Ellwardt E., Zipp F., 2014. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. *Exp. Neurol.* 262, 8-17.

Farias A.S., Spagnol G.S., Bordeaux-Rego P., Oliveira C.O., Fontana A.G., de Paula R.F., Santos M.P., Pradella F., Moraes A.S., et al., 2013. Vitamin D3 Induces IDO+ Tolerogenic DCs and Enhances Treg, Reducing the Severity of EAE. *CNS Neurosci. Therap.* 19, 269–277.

Ferreira G.B., Kleijwegt F.S., Waelkens E., Lage K., Nikolic T., Hansen D.A., Workman C.T., Roep B.O., et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes tolerogenic dendritic cells with functional migratory properties in NOD mice. *J. Immunol.* 2014, 192:4210-20.

Fissolo N., Costa C., Nurtdinov R.N., Bustamante M.F., Llombart V., Mansilla M.J., Espejo C., Montalban X., et al., 2012. Treatment with MOG-DNA vaccines induces CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and up-regulates genes with neuroprotective functions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroinflam.* 9, 139.

França T.G., Chiuso-Minicucci F., Zorzella-Pezavento S.F., Ishikawa L.L., da Rosa L.C., Colavite P.M., Marques C., Ikoma M.R., et al., 2014. Previous infection with

Staphylococcus aureus strains attenuated experimental encephalomyelitis. *BMC Neurosci.* 15, 8.

Furuzawa-Carballeda J., Vargas-Rojas M.I., Cabral A.R., 2007. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun. Rev.* 6, 169-175.

Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thery C., Amigorena S., 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621–667.

Han G., Li F., Singh T.P., Wolf P., Wang XJ., 2012. The Pro-inflammatory Role of TGFβ1: A Paradox? *Int. J. Biol. Sci.* 8, 228-235.

Harishankar M., Afsal K., Banurekha V.V., Meenakshi N., Selvaraj P., 2014. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 downregulates pro-inflammatory cytokine response in pulmonary tuberculosis. *Int. Immunopharmacol.* 23, 148-152.

He X., Yan J., Zhu X., Wang Q., Pang W., Qi Z., Wang M., Luo E., et al. , 2014. Vitamin d inhibits the occurrence of experimental cerebral malaria in mice by suppressing the host inflammatory response. *J. Immunol.* 193, 1314-1323.

Jeffery L.E., Burke F., Mura M., Zheng Y., Qureshi O.S., Hewison M., Walker L.S., Lammas D.A., et al., 2009. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J. Immunol.* 183, 5458-5467.

Joshi S., Pantalena L.C., Liu X.K., Gaffen S.L., Liu H., Rohowsky-Kochan C., Ichiyama K., Yoshimura A., et al., 2011. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol. Cell Biol.* 31, 3653-3669.

Kang Y., Xu L., Wang B., Chen A., Zheng G., 2008. Cutting Edge: Immunosuppressant as Adjuvant for Tolerogenic Immunization. *J. Immunol.* 180, 5172–5176.

Kang Y., Zhao J., Liu Y., Chen A., Zheng G., Yu Y., Mi J., Zou Q., et al., 2009. FK506 as an adjuvant of tolerogenic DNA vaccination for the prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Gene. Med.* 11, 1064-1070.

Kavousanaki M., Makrigiannakis A., Boumpas D., Verginis P., 2010. Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum.* 62, 53-63.

Khoo A.L., Joosten I., Michels M., Woestenenk R., Preijers F., He X.H., Netea M.G., van der Ven A.J.A.M., et al., 2011. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation but not the suppressive function of regulatory T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Immunol.* 134, 459-68.

Korn T., Reddy J., Gao W., Bettelli E., Awasthi A., Petersen T.R., Bäckström B.T., Sobel R.A., et al., 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* 13, 423–431.

Krementsov D.N., Teuscher C., 2013. Environmental factors acting during development to influence MS risk: insights from animal studies. *Mult. Scler.* 19, 1684-9.

Lemire J.M., Archer D.C., 1991. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* 87, 1103-1107.

Levy-Barazany H., Barazany D., Puckett L., Blanga-Kanfi S., Borenstein-Auerbach N., Yang K., Peron J.P., Weiner H.L., et al., 2014. Brain MRI of nasal MOG therapeutic effect in relapsing-progressive EAE. *Exp. Neurol.* 255, 63-70.

Leyssens C., Verlinden L., Verstuyf A., 2014. The future of vitamin D analogs. *Front. Physio.* 5, 122.

Lin R., Charlesworth J., van der Mei I., Taylor B.V., 2012. The genetics of multiple sclerosis. *Pract. Neurol.* 12, 279-88.

Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implication for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707-17.

Luchtman D.W., Ellwardt E., Larochelle C., Zipp F., 2014. IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: Current and future developments. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 403-13.

Majewska M., Zajac K., Srebro Z., Sura P., Ksiazek L., Zemelka M., Szczepanik M., 2007. Epicutaneous immunization with myelin basic protein protects from the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pharmacol. Rep.* 59, 74-79.

Mannie M.D., Blanchfield J.L., Islam S.M., Abbott D.J., 2012. Cytokine-neuroantigen fusion proteins as a new class of tolerogenic, therapeutic vaccines for treatment of inflammatory demyelinating disease in rodent models of multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 3, 255.

Mosayebi G., Ghazavi A., Ghasami K., Jand Y., Kokhaei P., 2011. Therapeutic effect of vitamin D3 in multiple sclerosis patients. *Immunol. Invest.* 40, 627-639.

Segovia-Gamboa N., Rodríguez-Arellano M.E., Rangel-Cruz R., Sánchez-Díaz M., Ramírez-Reyes J.C., Faradji R., González-Domínguez E., Sánchez-Torres C., 2014. Tolerogenic dendritic cells induce antigen-specific hyporesponsiveness in insulin- and glutamic acid decarboxylase 65-autoreactive T lymphocytes from type 1 diabetic patients. *Clin. Immunol.* 154, 72-83.

Smigiel K.S., Srivastava S., Stolley J.M., Campbell D.J., 2014. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunol. Rev.* 259, 40–59.

Sospedra M., Martin R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683-747.

Spach K.M., Nashold F.E., Dittel B.N., Hayes C.E., 2006. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 177, 6030-6037.

Steinman L., 2010. Inverse vaccination, the opposite of Jenner's concept, for therapy of autoimmunity. *J. Internal. Med.* 267, 441-451.

Steinman M., Hemmi H., 2006. Dendritic Cells: Translating Innate to Adaptive Immunity. In *Innate Immunity to Immunological Memory*. Volume 311. Edited by Pulendran, B and R Ahmed, New York: Current Topics in Microbiology and Immunology (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 17-58.

Taher Y.A., van Esch B.C., Hofman G.A., Henricks P.A., van Oosterhout A.J., 2008. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF- β . *J. Immunol.* 180, 5211-5221.

Takeda M., Yamashita T., Sasaki N., Nakajima K., Kita T., Shinohara M., Ishida T., Hirata K., 2010. Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2495-2503.

van Brussel I., Lee W.P., Rombouts M., Nuyts A.H., Heylenc M., De Winter B.Y., Cools N., Schrijvers D.M., 2014. Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat

autoimmune diseases: Can the unattainable dream turn into reality? *Autoimmun. Rev.* 13, 138–150.

Viglietta V., Beacher A.C., Weiner H.L., Hafler D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199, 971–979.

Wang T.T., Nestel F.P., Bourdeau V., Nagai Y., Wang Q., Liao J., Tavera-Mendoza L., Lin R., et al., 2004. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.* 173, 2909-2912.

Weber M.S., Prod'homme T., Youssef S., Dunn S.E., Steinman L., Zamvil S.S., 2014. Neither T-helper type 2 nor Foxp3+ regulatory T cells are necessary for therapeutic benefit of atorvastatin in treatment of central nervous system autoimmunity. *J. Neuroinflamm.* 11, 29.

World Health Organization. Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008 [http://www.who.int/mental_health/neurology/atlas_multiple_sclerosis_resources_2008/en/].

Wu J., Zhou C., Robertson J., Weng C.C., Meistrich M.L., Tailor R.C., Lou Y.H., 2010. Identification of a bone marrow derived CD8 $\alpha\alpha$ + dendritic cell like population in inflamed autoimmune target tissue with capability of inducing T cell apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 88, 849–861.

Zorzella-Pezavento S.F., Chiuso-Minicucci F., França T.G., Ishikawa L.L., da Rosa L.C., Colavite P.M., Marques C., Ikoma M.R., et al., 2014. Downmodulation of peripheral MOG-specific immunity by pVAXhsp65 treatment during EAE does not reach the CNS. *J. Neuroimmunol.* 268, 35-42.