

Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento

**Efeito modulador de estratégias vacinais para
tuberculose na encefalite autoimune
experimental (EAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

BOTUCATU – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Zorzella-Pezavento, Sofia Fernanda Gonçalves.

Efeito modulador de estratégias vacinais para tuberculose na encefalite autoimune experimental (EAE) / Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado)– Universidade Estadual Paulista, Faculdade Medicina de Botucatu, 2009

Orientadora: Alexandrina Sartori

1. Encefalite - Aspectos imunológicos - Estudos experimentais
2. Vacina gênica 3. Tuberculose

CDD 616.61

Palavras-chave: BCG; encefalite autoimune experimental; hsp65; tuberculose; vacina gênica

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir,
mas também sonhar; não apenas planejar,
mas também acreditar.”*

Anatole France

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Ao meu esposo Rodrigo, pelo carinho, compreensão e incentivo e por sempre me apoiar em todos os momentos importantes da minha vida. Você me fortalece para que eu consiga conquistar meus sonhos e me traz tranqüilidade para enfrentar as dificuldades. Amo você...

Aos meus pais, Antonio e Miriam, pelo apoio, dedicação e estímulo que possibilitaram a concretização de mais esse sonho. Desde o meu ingresso à universidade, foram meus grandes incentivadores. Agradeço por sempre estarem ao meu lado.

Agradecimientos

Agradeço especialmente,

À minha orientadora Alexandrina Sartori, pela confiança, paciência e disponibilidade que possibilitou a concretização desse trabalho. Desde a minha Iniciação Científica, você me orienta com muita determinação, competência e empolgação, qualidades que me estimulam a seguir a carreira acadêmica. Enfim, agradeço pela imensurável contribuição para minha formação profissional e por me incentivar a querer sempre mais.

Agradeço,

Primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus companheiros de pesquisa, Fernanda, Thaís, Larissa, Clara, Nelson e Douglas e aos mais novos integrantes, Raphael e Larissa pelo auxílio valioso na realização desse trabalho e pelos momentos descontraídos, que minimizam as dificuldades. Tenho muito orgulho de dizer que somos uma verdadeira equipe.

Às minhas madrinhas, Fernanda e Thaís pelo apoio, carinho e amizade sincera que cultivamos nesses últimos anos.

A todos os meus familiares pelo apoio que sempre me deram e pelos momentos descontraídos que tornam desejáveis os finais de semana.

À Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares e à Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli pelas valiosas sugestões e todo o empenho durante meu exame de qualificação.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem pela grandiosa contribuição para a minha formação profissional.

Aos pós-graduandos do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo apoio e pelo conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial ao Lula, pela preciosa ajuda no manuseio dos animais do biotério e ao Luiz, pelas coletas de soro e preparo de soluções.

À equipe pertencente ao Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT – FMRP – USP), em nome do Prof. Dr. Célio Lopes Silva, pelo fornecimento da vacina gênica DNAhsp65 e pela confiança depositada em nosso trabalho.

À Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente à Regina e ao Nathanael, pela atenção sempre dispensada.

Aos funcionários da biblioteca da UNESP de Botucatu, especialmente à Selma e à Meire, pela correção das referências bibliográficas.

Ao grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) – Regional de Botucatu que gentilmente nos forneceu o BCG.

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para minha formação profissional.

Muito obrigada !!!

Sumário

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas

1. Introdução	21
1.1. Esclerose Múltipla (EM)	21
1.2. Encefalite autoimune experimental (EAE)	21
1.3. Tuberculose (TB)	22
1.4. Vacina gênica	24
1.5. DNAhsp65	25
1.6. Efeito imunomodulador de vacinas para tuberculose em doenças autoimunes	26
1.7. Proteínas de choque térmico	28
1.7.1. Aspectos gerais e regulação da autoimunidade	28
1.7.2. Participação da hsp65/hsp60 na EM e na EAE	29
2. Objetivos	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. Material e Métodos	35
3.1. Delineamento experimental geral	35
3.2. Animais	35
3.3. Purificação de DNA (vetor e vacina)	35
3.4. Imunização com DNA	36
3.5. Imunização com BCG	36
3.6. Obtenção de hsp65 recombinante	36
3.7. Cultura de células	37
3.8. ELISA para detecção de citocinas	37
3.9. ELISA para detecção de anticorpos	38
3.10. Indução de EAE	38
3.11. Avaliação do escore clínico	39
3.12. Análise histopatológica	39
3.13. Análise estatística	39
4. Protocolos Experimentais e Resultados	41

4.1. Protocolo Experimental I	41
4.1.1. Resultados Protocolo Experimental I	42
4.2. Protocolo Experimental II	48
4.2.1. Resultados Protocolo Experimental II	49
4.3. Protocolo Experimental III	68
4.3.1. Resultados Protocolo Experimental III	69
5. Discussão	86
6. Referências Bibliográficas	96
7. Anexos	107
7.1. Comitê de Ética	107
7.2. Manuscrito I	108

Resumo

RESUMO

A única vacina disponível contra a tuberculose (TB) é o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), que é constituída por uma cepa de *Mycobacterium bovis* vivo atenuado, mas que possui variabilidade de proteção de 0 a 80%. Portanto é necessário o desenvolvimento de novas vacinas para o controle dessa infecção. Dentre as novas formulações profiláticas em teste para TB destacam-se as vacinas gênicas, sendo a DNAhsp65 a vacina investigada por nosso grupo. A DNAhsp65 é uma construção que contém o gene que codifica a proteína de choque térmico de 65KDa do *M. leprae*. Em virtude da elevada homologia entre a hsp65 micobacteriana e a hsp60 dos mamíferos, pode ocorrer mimetismo antigênico, ou seja, reatividade cruzada entre anticorpos e células T específicas para hsp65 micobacteriana e hsp60 humana. Nesse contexto, nosso grupo tem estudado o possível efeito colateral da DNAhsp65 no desenvolvimento de doenças autoimunes. Neste projeto foi investigado o efeito (proteção, exacerbação ou inocuidade) de diferentes formulações vacinais para TB na encefalite autoimune experimental (EAE). Os objetivos foram caracterizar a resposta imune específica induzida pela DNAhsp65 em ratos Lewis e avaliar o efeito imunomodulador tanto da estratégia clássica de imunização (3 doses de DNAhsp65 por via im) quanto da estratégia prime-boost BCG / DNAhsp65, nas características clínicas, imunológicas e histológicas da EAE. Quanto à imunogenicidade da DNAhsp65, foram testadas duas doses da vacina administradas via intramuscular (100 e 300 µg), sendo que somente a maior dose induziu IgG2b específica para hsp65 e produção de IFN- γ em cultura de células esplênicas estimuladas *in vitro* com rhsp65. Para avaliar o efeito da imunização com DNAhsp65 ou do *prime-boost* BCG /DNAhsp65 no desenvolvimento da EAE, os animais foram previamente imunizados com 3 doses de 300 µg de DNAhsp65 ou com 0,1 mL de BCG por via subcutânea seguido de 2 doses de 300 µg de DNAhsp65. Quinze dias após a última inoculação de DNA, os ratos foram submetidos à indução de EAE com mielina emulsificada em ACF. Os parâmetros analisados foram: perda de peso, escore clínico, inflamação no sistema nervoso central (SNC) e resposta imune anti-mielina. A evolução clínica da EAE foi similar entre os animais vacinados e não vacinados, mas a análise histopatológica demonstrou que a imunização prévia com DNAhsp65 ou BCG / DNAhsp65 diminui o processo inflamatório no

cérebro e na porção lombar da medula espinhal. Esse efeito foi acompanhado de uma modulação da produção de citocinas em órgãos linfóides secundários. Houve uma redução da produção de IFN- γ em culturas de células de baço e da produção de IL-10 em culturas de linfonodo estimuladas *in vitro* com mielina. Esse fenômeno foi mais claro em ratos imunizados com a vacina gênica sozinha se comparado com a estratégia de *prime-boost*. Este trabalho demonstrou que essas estratégias para a profilaxia da tuberculose não agravaram ou aceleraram a esclerose múltipla, podendo, então, ser consideradas seguras nesse aspecto. Além disso, essas estratégias vacinais demonstraram um potencial antiinflamatório, o qual poderá ser esclarecido mais detalhadamente em estudos futuros.

Palavras-chave: encefalite autoimune experimental, vacina gênica, hsp65, BCG, tuberculose.

Abstract

ABSTRACT

BCG is the only accepted vaccine against tuberculosis (TB) but its protective ability is very limited. Many new vaccines are therefore being evaluated. Our group has been working with DNAhsp65 that is a genetic construction containing the gene of hsp65 from *Mycobacterium leprae*. In previous experimental work we demonstrated that both, DNAhsp65 alone or associated with BCG, in a prime-boost regimen, were effective to control TB. A possible deleterious effect related to autoimmunity needed to be tested because hsp65 is highly homologous to the correspondent mammalian protein. In this investigation we tested the effect of a previous immunization with DNAhsp65 alone or associated with BCG in a rat model of multiple sclerosis. Female Lewis rats were immunized with 3 doses of DNAhsp65 or primed with BCG followed by 2 DNAhsp65 boosters. The animals were then immunized with myelin associated with Complete Freund Adjuvant to develop experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The following parameters were evaluated: weight loss, clinical score, inflammation at the central nervous system (CNS) and immune response against myelin. No deleterious effect was associated with these immunizations schedules. Immunized animals equally lost weight, the clinical scores were similar and inflammation at the CNS did not increase. Interestingly, both procedures determined decreased inflammation in the brain and lumbar spinal cord. This was concurrent with a modulatory effect over cytokine production by peripheral lymphoid organs. Cell cultures from spleen and lymph nodes *in vitro* stimulated with myelin produced less IFN- γ and IL-10, respectively. This phenomenon was more clear in rats immunized with the genetic vaccine alone than with the prime-boost strategy. Together the results suggest that these strategies for TB prophylaxis would not accelerate or aggravate MS, being therefore, safe in this aspect. In addition, they indicate that these vaccination regimens have a potential anti-inflammatory activity that could be better explored in the future.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis, DNA vaccine, hsp65, BCG, tuberculosis

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACF: Adjuvante Completo de Freund
- ANOVA: análise de variância
- APC: célula apresentadora de antígeno
- BCG: Bacilo de Calmette-Guérin
- ConA: concanavalina A
- CpG: seqüência de nucleotídeos de citosina-fosfato-guanina
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- DO: densidade óptica
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- EAE: encefalite autoimune experimental
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- EM: Esclerose múltipla
- EPM: erro padrão da média
- H&E: coloração de hematoxilina / eosina
- Hsp: proteína de choque térmico
- id: via intradérmica
- IFN- γ : interferon-gama
- IL-4: interleucina 4
- IL-10: interleucina 10
- im: via intramuscular
- IPTG: isopropil-tio- β -D-galactosídeo
- KDa: kilodalton
- LB: meio Luria – Bertani
- M: molar
- MBP: proteína básica de mielina
- MHC: complexo principal de histocompatibilidade
- MOG: *myelin oligodendrocyte glycoprotein*
- Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*
- NOD: *non-obese diabetic mice*
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- OPD: ortofenilenodiamina

- PBS: solução salina tamponada com fosfato
- PLP: *proteolipid protein*
- pVAX: vetor plasmidial sem o inserto
- pVAXhsp65: vacina gênica contendo o gene que codifica a hsp65 micobacteriana.
- rhsp65: proteína de choque térmico de 65KDa recombinante
- RNA: ácido ribonucléico
- RPMI: meio líquido para cultura de células (Roswell Park Memorial Institute)
- sc: via subcutânea
- SNC: Sistema Nervoso Central
- TB: tuberculose
- Tc: célula T citotóxica
- Th: célula T auxiliar
- TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
- Treg: célula T reguladora
- UFC: unidade formadora de colônia

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Esclerose Múltipla (EM)

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC) que é descrita como a causa principal de incapacidade neurológica em adultos jovens. A doença afeta 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo uma maior prevalência na Europa e na América do Norte. Além disso, a EM acomete mais mulheres do que homens, na razão 2:1 (WHO, 2006). Os custos pessoais, econômicos e sociais desta doença são muito elevados (Imitola et al., 2005). As manifestações clínicas iniciais da EM incluem: fraqueza de um ou mais membros, perda da visão, falta de coordenação motora e parestesia (Silberberg, 1992). A maioria dos pacientes apresenta um quadro transitório de sintomas com recidivas da doença, seguido por uma fase secundária progressiva, caracterizada por perdas irreversíveis e neurodegeneração. Causa e patogênese da EM não são completamente conhecidas, mas ainda se acredita que esta seja, fundamentalmente, uma doença autoimune mediada por células Th1 com especificidade para antígenos do SNC, tendo as citocinas como TNF- α , IFN- γ e a emergente IL-17, um papel importante no processo inflamatório e conseqüente degeneração axonal, morte dos oligodendrócitos e disfunção neuronal (Steinman 1996; Lucchinetti et al., 2000; Elloso et al., 2005; Sospedra & Martin, 2005; Furuzawa-Carballeda et al., 2007). As principais características histológicas da EM são infiltração de células T, B e macrófagos, além de degradação da mielina, que se estende aos axônios e astrócitos. Não há cura para a esclerose múltipla, sendo que o tratamento é baseado no uso de drogas imunomoduladoras, como o IFN- β e o acetato de glatiramer, que reduzem a frequência e a gravidade das remissões (WHO, 2006).

1.2 – Encefalite Autoimune Experimental (EAE)

A encefalite autoimune experimental (EAE) tem sido utilizada como modelo animal para o estudo da esclerose múltipla em humanos. Esta doença é induzida principalmente em camundongos e ratos através da imunização com antígenos derivados de mielina (*myelin basic protein* – MBP, *proteolipid protein* – PLP, *myelin oligodendrocyte glycoprotein* – MOG ou peptídeos derivados destas proteínas) em associação com o Adjuvante Completo de Freund (ACF). A

transferência adotiva de células T específicas para mielina também desencadeia a doença, indicando que a EAE é uma doença autoimune mediada pela resposta imune celular (Link & Xiao, 2001).

Uma única inoculação com homogenato de medula espinhal, mielina ou peptídeos encefalitogênicos derivados de mielina, associados ao ACF, resultam em quase 100 % de doença em ratos Lewis. A EAE nesta cepa de ratos é caracterizada como uma doença aguda, grave e monofásica acompanhada por infiltração de células T no SNC e ativação da microglia (Namer et al., 1998). As características histopatológicas no rato Lewis incluem infiltração mononuclear meníngea, perivascular e parenquimal no SNC (Link & Xiao, 2001). Este modelo tem sido utilizado principalmente para investigar os mecanismos imunológicos envolvidos na EM e para testar possíveis estratégias terapêuticas (Liu et al., 1998).

A EAE tem sido classicamente considerada uma doença Th1 não só porque clones Th1 específicos para mielina transferem adotivamente a doença, mas também porque tem sido demonstrado que citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α danificam a bainha de mielina (Klinkert et al., 1997). Entretanto, mais recentemente, outros tipos de células T efetoras tais como Tc e Th17 também podem contribuir com esta patologia. Células Th17 têm sido consideradas indutoras potentes de autoimunidade (Langrish et al., 2005). A expressão de IL-17 tem sido associada com diversas doenças autoimunes como artrite reumatóide, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (Matusevicius et al., 1999; Kolls & Lindén, 2004). Estudo recente demonstrou que a IL-17 está presente em grande quantidade nas lesões do SNC em pacientes com esclerose múltipla (Lock et al., 2002). Além disso, concentrações significativamente mais elevadas de IL-17 foram descritas no fluido cerebrospinal de pacientes com esclerose múltipla quando comparado com indivíduos saudáveis (Ishizu et al., 2005).

1.3 – Tuberculose (TB)

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada, na maioria dos casos humanos, pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A infecção pulmonar é a mais comum, mas comprometimento de outros órgãos e inclusive doença

disseminada (TB miliar) podem ser observados. A infecção ocorre quando pacientes com doença ativa, ao respirar ou tossir, liberam os bacilos que podem ser transmitidos por via aérea. O estabelecimento da infecção depende de vários fatores, tais como número e virulência dos bacilos inalados, tempo de exposição aos mesmos, além das características imunológicas e genéticas do indivíduo exposto (Dannenbergh, 1993).

A gravidade da TB no mundo é evidenciada pelas informações epidemiológicas. Tem sido estimado que dois bilhões de pessoas, ou seja, mais ou menos 1/3 da espécie humana, está infectada com o Mtb. As estimativas mais recentes indicam 8,9 milhões de novos casos anuais de TB ativa e também prevêem que destes, 1,7 milhões de casos evoluirão para óbito. Além disto, a população mais atingida está na faixa etária de 15-49 anos, ou seja, o período economicamente mais produtivo. A incidência mais elevada ocorre na África Sub-Saariana (300 por 100.000/anualmente), em parte devido à associação com HIV (Meya & McAdam, 2007). Por enquanto, a situação brasileira não difere muito da descrita para outros países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil está incluído entre os 22 países nos quais ocorrem 80% dos casos de TB. Neste contexto, nosso país está classificado em 14º lugar em número de casos de TB. As estimativas também sugerem que aproximadamente 1/3 da população brasileira se encontra infectada com este bacilo e que 116.000 novos casos ocorram por ano (Jardim & Nascimento, 2007).

A resposta imune protetora contra a tuberculose é do tipo celular e envolve células Th1 e Tc (Kaufmann, 2001).

A única vacina disponível contra a TB é o BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), que é constituída por uma cepa de *Mycobacterium bovis* vivo atenuado. A vacinação com BCG é considerada segura, sendo apropriada para administração no período neonatal. A eficácia protetora desta vacina é muito variável (Fine, 1995; Pereira et al., 2007). O BCG é recomendado pela OMS para todas as crianças com menos de um ano de idade. É consenso que o BCG protege crianças contra as formas mais graves de TB como a miliar e a meníngea (Rodrigues et al., 1993; Colditz et al., 1995; Sterne et al., 1998). Apesar da extensa utilização, a eficácia desta vacina é muito discutida, havendo evidências de que o efeito protetor decai no decurso de 10 a 15 anos (Sterne et al., 1998) e de que a doença pulmonar no

adulto não é prevenida por vacinação neonatal, vacinação na adolescência e nem por revacinação com BCG (Karonga Prevention Trial Group, 1996).

Dentre as novas formulações profiláticas em teste para tuberculose destacam-se as vacinas gênicas.

1.4 – Vacina gênica

Vacinas genéticas são construídas pela inserção de um gene de interesse (gene que codifica um antígeno imunodominante) em um vetor que, normalmente, é um plasmídeo bacteriano. Esta construção genética possui outros componentes, tais como um promotor eucariótico, uma seqüência de finalização (poli A), um gene de resistência a antibiótico e um sítio de replicação (Nagata et al., 2004). As duas vias mais exploradas de inoculação para estas vacinas são a intramuscular, através de injeção no músculo quadríceps ou tibial anterior e a epidérmica, por inoculação com agulha ou por bombardeamento genético com uma pistola genética (gene gun) (Doria-Rose & Haigwood, 2003). O alvo celular vai depender da via de imunização: células musculares na via intramuscular (im) e queratinócitos na imunização intradérmica (id). Entretanto, o *priming* para a resposta imune vai depender de células apresentadoras de antígenos (APCs) que estão presentes ou que migram para o local da inoculação. Estas células endocitam o DNA que é transportado dentro de vesículas até o núcleo onde o gene de interesse é transcrito; o mRNA é transportado para o citoplasma e a proteína é então sintetizada (Huygen, 2005). Esta proteína pode ser processada no citoplasma da própria célula produtora e apresentada ou pode ser secretada e desta forma internalizada, processada e apresentada por outras APCs.

Vacinas gênicas são potencialmente capazes de induzir resposta imune humoral e celular devido a sua capacidade de estimular as duas vias principais de processamento: a via restrita por classe II (antígenos exógenos) e a via restrita por classe I (antígenos endógenos). O processamento via classe I resulta em elevada resposta do tipo Tc, tornando este tipo de vacina particularmente atraente para agentes infecciosos intracelulares. O contato dos plasmídeos com as células dendríticas ocorre tanto por transfecção direta quanto pelo fenômeno conhecido como *cross-priming*, ou seja, internalização de vesículas apoptóticas liberadas pelo miócitos transfetados (Heath et al., 2004). Tem sido constatado que imunização intramuscular induz resposta predominantemente Th1 enquanto que

imunização id com *gene gun* polariza a resposta no sentido Th2 (Feltquate et al., 1997).

A capacidade destas vacinas de gerar resposta imune protetora foi inicialmente comprovada por Ulmer et al., (1998), através de um modelo de influenza experimental. Desde então, várias publicações atestam a imunogenicidade e a eficácia protetora das vacinas gênicas em doenças infecciosas, câncer, alergia e doenças auto-imunes (Hartl et al., 2004; Kaslow, 2004; Pavlenko et al., 2005; Prud'homme et al., 2007).

1.5 – DNAhsp65

Vários genes codificando antígenos imunodominantes de Mtb são investigados quanto ao seu potencial como vacinas gênicas para TB. Entre eles se destaca o gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65). Em camundongos infectados com Mtb, 10 a 20 % das células T específicas ao agente infeccioso são reativas com a hsp65 (Kaufmann et al., 1987).

Pesquisadores do Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT- FMRP-USP) têm avaliado uma vacina gênica para tuberculose, baseada justamente no gene que codifica a proteína de choque térmico de 65kDa de *Mycobacterium leprae* (pVAXhsp65). Camundongos BALB/c imunizados por via intramuscular, com esta vacina gênica apresentaram elevada produção de IFN γ e baixos níveis de IL-4, indicando uma estimulação preferencial de células tipo Th1 (Bonato et al., 1998). Observou-se também produção de anticorpos específicos anti-hsp65, intensa resposta linfoproliferativa de células de baço estimuladas com hsp65 recombinante (Lowrie et al., 1997), aumento na frequência de células hsp65 reativas nos linfonodos e produção de células de memória (Bonato et al., 1998, Silva et al., 1999). Além disso, esta vacina desencadeou resposta imune protetora na TB experimental murina (Lowrie et al., 1999).

Outra alternativa vacinal investigada no CPT é a estratégia denominada *prime-boost*. Os protocolos de imunização do tipo *prime-boost* consistem na administração do mesmo antígeno em vetores diferentes. A exposição ao antígeno no primeiro vetor prima a resposta imune, enquanto que uma re-exposição ao mesmo antígeno, num segundo vetor, amplifica a resposta. Neste caso, a administração da proteína hsp65 micobacteriana presente no BCG e de

seu gene inserido na vacina de DNA se caracteriza como uma estratégia de *prime-boost*. Relatos da literatura sugerem que esta estratégia seja promissora na TB experimental (Ferraz et al., 2004; Mollenkopf et al., 2004). Além disso, publicação recente do CPT demonstrou que a utilização de *prime-boost* heterólogo BCG intra-nasal / DNAhsp65 im foi mais eficiente na proteção contra a infecção murina por *M. tuberculosis* se comparado a uma imunização somente com BCG intra-nasal ou com apenas 3 doses de DNAhsp65. Essa proteção foi observada através da detecção de menor carga bacteriana, da preservação do parênquima pulmonar e do aumento da imunogenicidade da vacina DNAhsp65 (Gonçalves et al., 2007).

1.6 – Efeito imunomodulador de vacinas para tuberculose em doenças autoimunes

Apesar do potencial profilático dessa vacina (DNAhsp65), existe uma grande preocupação no que concerne à sua segurança, devido à imunodominância deste antígeno e à homologia existente entre proteínas de choque térmico microbianas e humanas (Jones et al., 1993). Relatos indicam que a hsp60 humana está envolvida em várias doenças inflamatórias e autoimunes como diabetes insulino-dependente, artrite reumatóide, glomerulonefrite, doença de Hashimoto e esclerose múltipla (Lamb et al., 1989; Jones et al., 1993). Nesse contexto, nosso grupo passou a estudar inicialmente o papel da vacina DNAhsp65 na modulação de doenças autoimunes, utilizando modelos experimentais de artrite induzida por pristane em camundongos selecionados para elevada e baixa resposta inflamatória e diabetes mellitus em camundongos NOD. Os resultados obtidos até o momento apontam para um efeito protetor desta preparação vacinal, tanto na artrite quanto no diabetes experimental (Santos-Junior et al., 2005; Santos-Junior et al., 2007).

De modo semelhante, outros relatos da literatura também apontam para a utilização de vacinas gênicas com ação imunomoduladora em doenças autoimunes, como a artrite adjuvante. A artrite adjuvante é uma doença autoimune experimental induzida pela imunização de ratos Lewis com *M. tuberculosis* associado ao Adjuvante Incompleto de Freund. Essa artrite experimental é um modelo bem aceito de artrite reumatóide em humanos. Segundo Ragno et al., (1997), ratos Lewis imunizados por via intramuscular com

vacina de DNA, cujo inserto codifica a proteína de choque térmico micobacteriana de 65kd (hsp65), apresentaram resistência à indução posterior de artrite adjuvante. Posteriormente, Quintana et al., (2002) verificaram inibição da artrite adjuvante em ratos Lewis pela administração de uma vacina de DNA codificando a hsp60 humana, que resultou em aumento da produção de IFN- γ e TGF- β_1 por células T estimuladas com hsp60. Quintana et al., (2003) demonstraram que uma vacina de DNA que codifica fragmentos da proteína hsp60 humana também inibiu a indução de artrite adjuvante em ratos Lewis. Esta resposta regulatória à vacinação com hsp60 humana ou fragmentos, incluiu tanto um padrão de resposta Th1, pela secreção de IFN- γ , quanto Th2/Th3, pela secreção de IL-10 e TGF- β_1 . Esse mesmo grupo verificou que a imunização de ratos Lewis com vacinas de DNA, codificando hsp70 ou hsp90 humanas, também inibia o desenvolvimento de artrite adjuvante. Esta proteção estava associada com alteração da resposta das células T artritogênicas de um padrão Th1 para um padrão Th2/Th3 (Quintana et al., 2004).

A vacinação com BCG também tem sido descrita como capaz de suprimir alguns processos autoimunes. Um primeiro relato de que o BCG poderia ser utilizado para proteção da artrite adjuvante foi publicado por van Eden et al., em 1988. Nesse estudo foram isoladas linhagens de células T artritogênicas para demonstrar que antígenos do *M. tuberculosis* contêm epítopos de reatividade cruzada com auto-antígenos presentes nas cartilagens das articulações. A administração desses antígenos a ratos induziu resistência a indução posterior de artrite. Posteriormente, essa seqüência de aminoácidos foi caracterizada como sendo uma porção peptídica da proteína de choque térmico de 65kDa (hsp65) do BCG e conferiu proteção completa a ratos Lewis contra indução de artrite adjuvante por *M. tuberculosis* (Yang et al., 1990). Além disso, a administração de BCG por via oral também inibiu significativamente o desenvolvimento dessa doença em ratos susceptíveis (Bersani-Amado et al., 1990).

Alguns estudos também propõem o emprego do BCG na prevenção do diabetes experimental. O diabetes mellitus tipo I é uma doença causada pela destruição imunológica das células beta pancreáticas. Uma única administração intravenosa de BCG suprimiu a insulite e manifestações do diabetes em camundongos NOD (Harada et al., 1990). Um estudo mais recente também mostrou redução da insulite e manifestações do diabetes em um modelo de

indução com baixas doses de estreptozotocina (Baik et al., 1999). O mecanismo de proteção induzido pelo BCG no diabetes experimental vem sendo estudado. Qin et al., (2004) sugerem que a imunização com BCG bloqueia a destruição autoimune pela indução de apoptose de células T diabetogênicas através da produção de TNF- α e IFN- γ e pela via Fas – Fas ligante.

A utilização do BCG na proteção contra a EAE também vem sendo investigada. Segundo O'Connor et al. (2005), camundongos infectados com BCG apresentaram uma sintomatologia clínica mais branda da EAE, se comparada aos animais não infectados com BCG. Os camundongos doentes infectados com BCG também apresentaram nível significativamente aumentado de apoptose de células TCD4+ encefalitogênicas em relação aos animais com EAE não infectados com BCG. Outros autores sugerem que essa infecção micobacteriana atenua, em parte, a gravidade da EAE através da eliminação das células TCD4+ autoreativas por apoptose (Sewell et al., 2003).

1.7 – Proteínas de choque térmico

1.7.1 – Aspectos gerais e regulação da autoimunidade

Existem diversas proteínas de choque térmico (hsps) que se classificam em famílias, de acordo com seu peso molecular. Fisiologicamente, as hsps funcionam como chaperonas, interagem com proteínas do citoesqueleto e modulam a ligação de hormônios esteróides a seus receptores nas células. Em determinadas situações de estresse, como alterações de temperatura, estímulo mecânico, isquemia, exposição a radicais livres e infecções, a produção de hsps é aumentada (Kaufmann et al., 1991). A hsp65, como as demais hsps, é filogeneticamente conservada e largamente encontrada na natureza em organismos procarióticos e eucarióticos, sendo muito imunogênica (Kaufmann,1990). As hsps são moléculas-alvo em várias infecções, inclusive naquelas provocadas por patógenos intracelulares. São proteínas celulares abundantes, tem epítomos conservados, podem sensibilizar o hospedeiro imunologicamente e são preferencialmente processadas para apresentação antigênica (Kaufmann et al., 1991). Apesar do acentuado grau de conservação filogenética, as hsps são conhecidas como antígenos imunodominantes. Como dissemos anteriormente, estresse celular desencadeia produção aumentada destas moléculas. Isto significa que as células sob estresse produzem, processam

e apresentam grandes quantidades de epítomos de hsps, no contexto de moléculas de histocompatibilidade, às células T. Diferentemente do que ocorre com os outros autoantígenos, o sistema imune saudável possui células T e B com especificidade para epítomos das suas próprias hsps. Acredita-se que o significado fisiológico deste reconhecimento cruzado de hsps próprias esteja conectado com o controle de processos inflamatórios. Neste contexto, existem evidências de que células T regulatórias induzidas por hsp tenham a capacidade de suprimir processos autoimunes (van Eden et al., 2003). As primeiras evidências desta atividade regulatória são oriundas de modelos de artrite. Após a definição da hsp60 micobacteriana como o antígeno mais relevante na artrite experimental em ratos (van Eden et al., 1988), várias tentativas de indução desta doença por imunização com hsp60 falharam. É importante ressaltar o fato de que essas imunizações terem induzido proteção contra indução subsequente da artrite. Uma análise cuidadosa mostrou que a imunização com hsp bacteriana induzia células T com especificidade tanto para a proteína bacteriana quanto para a própria hsp de rato, ou seja, eram induzidas células T que apresentavam reatividade cruzada com hsp própria do hospedeiro. A transferência destas células ou imunização com peptídeos conservados induziu proteção (Anderton et al., 1995). Em estudos posteriores foi constatada a produção de IL-10 por estas células T, o que poderia ser responsável por seu efeito regulador. Tem sido proposto que a expressão aumentada e seletiva das hsp nos sítios inflamatórios, em função da liberação de mediadores pró-inflamatórios, seja essencial para atrair estas células T reguladoras para estes locais. Estas constatações experimentais são coerentes com alguns achados clínicos. Em crianças com artrite crônica, se observa uma concomitância entre a remissão da doença e o aparecimento de respostas T específicas para hsp60 humana (Prakken et al., 1996). Esta modulação de quadros autoimunes é bastante promissora do ponto de vista terapêutico e profilático.

1.7.2 – Participação da hsp65/hsp60 na EM e na EAE

A participação da hsp65 na EAE tem sido menos investigada do que na artrite e no diabetes experimental. Proteínas de choque térmico são expressas constitutivamente em várias células do SNC (oligodendrócitos, astrócitos e neurônios). De maneira similar ao que ocorre em outros tecidos, sua presença

pode proteger as células de vários estímulos estressantes, tais como hipóxia, anóxia ou estimulação excessiva. Anticorpos contra hsp micobacteriana ligam-se em mielina e oligodendrócitos em regiões com desmielinização em pacientes com EM. Nestes pacientes também se observa resposta imune celular anti-hsp mais acentuada, principalmente no início da doença (Birnbaum,1995; Birnbaum & Kotilinek, 1999). A análise de células infiltrantes na EAE em ratos mostrou elevada frequência de células T específicas para proteína básica e para hsp65 (Mor & Cohen, 1992). Apesar da presença evidente de resposta anti-hsp65 na EM e na EAE, sua contribuição benéfica ou deletéria não foi ainda elucidada. Uns poucos trabalhos têm sugerido que a resposta anti-hsp possa contribuir para reduzir a incidência e gravidade desta doença (Birnbaum et al., 1996; Heneka et al., 2001). Além disso, Gao et al., (1995) avaliaram a hipótese de que a inflamação do SNC na EAE esteja associada com alteração da expressão de proteínas de choque térmico. Este trabalho demonstrou que a medula espinhal de camundongos normais apresentava imunorreatividade à hsp60 apenas nas mitocôndrias onde sua expressão é constitutiva. Em animais com EAE ocorreu um aumento na expressão de hsp65. Na fase aguda, este aumento esteve relacionado com células infiltrantes, enquanto que na fase crônica, esta expressão esteve associada aos componentes do SNC, como oligodendrócitos e astrócitos. Outro aspecto da patogenia tanto da EAE quanto da EM é a morte de oligodendrócitos, que são células produtoras de mielina. A destruição dessas células pode estar relacionada à expressão de proteínas de choque térmico, principalmente hsp60, reconhecidas por células T gama-delta, que têm sido localizadas nas lesões crônicas e que possuem atividade citolítica (Raine, 1994).

No seu conjunto, os dados existentes na literatura sugerem que esta vacina genética para TB, seja ela administrada isoladamente ou associada ao BCG, não deva exacerbar a EAE. Entretanto, é importante que esta suposição seja investigada e comprovada em termos experimentais. Além disto, a associação BCG / DNA poderá ter um resultado diferente do previsto em bases teóricas, uma vez que BCG por via intradérmica e DNAhsp65 por via intramuscular são fortes indutores de resposta imune celular que é justamente o tipo de resposta imune envolvido na EM / EAE.

Por outro lado, baseado em resultados anteriores que verificaram um efeito protetor da imunização com a vacina gênica DNAhsp65 em outros dois

modelos de doenças autoimunes, artrite e diabetes experimental, a inoculação de DNAhsp65 ou da associação BCG / DNAhsp65 poderia resultar em um efeito protetor na encefalite autoimune experimental.

Objetivos

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar o efeito (proteção, exacerbação ou inocuidade) de estratégias vacinais para tuberculose nas características clínicas, imunológicas e histopatológicas da EAE em ratos Lewis, que é considerada um modelo para o estudo da esclerose múltipla humana.

2.2 – Objetivos específicos:

- 1- Caracterizar a resposta imune específica, humoral e celular, desencadeada pela vacina gênica para tuberculose (DNAhsp65) em ratos Lewis.
- 2- Avaliar o efeito imunomodulador do protocolo clássico de imunização com DNAhsp65 (3 doses / via im) nas características clínicas, histológicas e imunológicas da EAE.
- 3- Avaliar o efeito imunomodulador da estratégia vacinal: BCG (1 dose / via subcutânea) / DNAhsp65 (2 doses / via im), nas características clínicas, histológicas e imunológicas da EAE.

Material e Métodos

3 – Material e Métodos

3.1 – Delineamento experimental geral

O efeito das estratégias vacinais no desenvolvimento da EAE foi investigado pela imunização prévia dos animais com DNAhsp65 ou BCG / DNAhsp65, seguido de indução de EAE com mielina emulsificada em Adjuvante Completo de Freund (ACF). Como os ensaios pré-clínicos feitos com esta vacina até o momento incluíram somente camundongos e cobaias, era importante que fosse comprovada a imunogenicidade da mesma em rato Lewis. Para isto, foram utilizadas diferentes doses de DNAhsp65 para induzir resposta imune, a qual foi avaliada pela produção de anticorpos e citocinas (protocolo I). A dose da vacina que induziu resposta imune significativa nos animais foi utilizada nos protocolos II e III.

3.2 – Animais

Foram utilizados ratos Lewis (fêmeas) com 4-6 semanas de idade, provenientes do CEMIB – UNICAMP / Campinas, com peso corporal entre 120 e 150 g. Os animais foram alojados em caixas plásticas com água e alimentos *ad libitum*. Os experimentos foram realizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina – UNESP / Botucatu.

3.3 – Purificação do DNA (vetor e vacina)

A purificação dos plasmídeos utilizados na imunização foi realizada seguindo-se o protocolo do KIT CONCERT HIGH PURITY (Life Technologies), que utiliza colunas de resina de troca iônica para a purificação do DNA. Resumidamente, colônia isolada de *E. coli* transformada foi cultivada durante 6-8 horas sob agitação, em meio LB Broth (Difco/Becton & Dickinson) contendo canamicina. A partir de diluição 1:1000 deste crescimento foi iniciada cultura para obtenção de massa bacteriana. A massa bacteriana foi lisada por adição de tampão de lise alcalina, seguida de tampão de neutralização. Após centrifugação, o sobrenadante foi aplicado em coluna de sepharose e o plasmídeo retido foi eluído e, posteriormente, precipitado com isopropanol. O sedimento contendo o DNA foi ressuspensão em água estéril e

quantificado em Gene Quant (Pharmacia). Alíquotas de vetor (pVAX) e vacina (pVAXhsp65) foram digeridos com enzimas de restrição e aplicados em gel de agarose 1% para verificar a qualidade e pureza das construções. Este material foi fornecido pelo Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT- FMRP-USP) com o qual temos um intercâmbio científico.

3.4 – Imunização com DNA

Os animais do protocolo I receberam 3 doses de DNA (vetor ou vacina) em diferentes concentrações (100 ou 300 µg). Cada animal do protocolo II recebeu 3 doses de DNA (vetor ou vacina) na concentração de 300 µg. Cada animal do protocolo III recebeu 2 doses de DNA (vetor ou vacina) na concentração de 300 µg. Cada dose (100 µL) de DNA continha 25% de sacarose e foi administrada no músculo quadríceps (50 µL no direito e 50 µL no esquerdo). O intervalo entre as doses foi de 15 dias.

3.5 – Imunização com BCG

Cada animal do Protocolo Experimental III recebeu 1 dose de BCG (0,1 mL) por via subcutânea (sc) contendo 2 a 10×10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) na base da cauda (Itil et al., 2006).

3.6 – Obtenção de hsp65 recombinante (rhsp65)

Escherichia coli DH5 α contendo o plasmídeo que codifica a hsp65 foi submetida à indução com IPTG (isopropil-tio- β -D-galactosídeo). Após a indução, as bactérias foram centrifugadas e o sedimento lavado três vezes com tampão CE (citrato de sódio 30 mM, EDTA 10 mM, pH 6,0). O sedimento foi ressuspenso em tampão UPE (uréia 6 M, tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e EDTA 20 mM) e as bactérias foram lisadas em sonicador em banho de gelo. O material foi centrifugado e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio 1 M em banho de gelo, por 30 minutos. O material precipitado foi ressuspenso em tampão Tris-HCl (40 mM / NaCl 20 mM, pH 7,0) e dialisado contra o mesmo tampão. A proteína obtida foi esterilizada por filtração, quantificada, alíquotada e armazenada a -70°C. Este material foi fornecido pelo Centro de Pesquisas em

Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT- FMRP-USP) com o qual temos um intercâmbio científico.

3.7 – Cultura de células

No protocolo I, os animais foram sacrificados 15 dias após o término da imunização com DNA. Nos protocolos II e III, os animais foram sacrificados na fase de recuperação da doença, ou seja, logo após o desaparecimento dos sintomas clínicos. Baço e linfonodos regionais (linfonodos poplíteos e inguinais) foram coletados para preparo de culturas celulares. Os órgãos foram divulsionados e as células centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI contendo gentamicina, soro bovino fetal e L-glutamina. As células de baço (5×10^6 células/mL) e linfonodos ($2,5 \times 10^6$ células/mL), foram distribuídas em placas de cultura e estimuladas com rhsp65 (10 μ g/mL de cultura), mielina (10 μ g/mL de cultura) e concanavalina A (5 μ g/mL de cultura). Após incubação por 48 horas, a 37°C, em estufa de CO₂, os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados a -70°C para posterior dosagem de citocinas.

3.8 – ELISA para detecção de citocinas

Os sobrenadantes das culturas de baço e linfonodo dos protocolos I, II e III foram avaliados quanto à produção de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-IL-4 ou anti-IL-10 de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS na concentração 2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 2 μ g/mL e 4 μ g/mL, respectivamente. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0,05%) foi adicionada 300 μ L da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina bovina (Sigma), com incubação por 2 horas, a temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por duas horas, a temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de citocinas, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina bovina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-IL-4 ou anti-IL-10 de rato biotinizados na concentração 150 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL, durante 2 horas, à temperatura ambiente.

Posteriormente, seguiu-se a incubação com estreptoavidina diluída 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina bovina, durante 20 minutos, a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com ortofenilenodiamina (OPD - Sigma). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 2N e a leitura realizada em 492 nm. O nível de detecção das citocinas foi de 19,5 pg/mL para o IFN- γ ; 31,25 para o TNF- α ; 15,6 para a IL-4 e 31,25 para a IL-10.

3.9 – ELISA para detecção de anticorpos (anti-hsp65 e anti-mielina)

Soros dos animais do protocolo experimental I foram utilizados para a detecção de anticorpos específicos anti-hsp65 e os soros dos animais dos protocolos II e III foram utilizados para a detecção de anticorpos específicos anti-hsp65 e anti-mielina. Placas de 96 poços foram recobertas com 100 μ L/poço da proteína rhsp65 ou mielina na concentração de 5 μ g/mL, diluída em tampão de ligação (Na₂CO₃ 17 mM, NaHCO₃ 9,6 mM, pH 9,6) e incubadas a 4°C, durante uma noite. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween 20 0,05% e bloqueadas com 300 μ L por poço de PBS / Tween 20 0,05% e soro fetal bovino 10%. As placas foram incubadas por uma hora, a 37°C e lavadas novamente. As amostras de soro foram diluídas 1/10 e 1/50 (rhsp65) e 1/1000 e 1/5000 (mielina) em tampão de bloqueio e incubadas a 4°C, por uma noite. As placas novamente lavadas foram incubadas por mais uma noite, a 4°C com 100 μ L por poço de anticorpo biotilado anti-IgG1 ou anti-IgG2b de rato (Oxford Biotechnology) diluído em tampão de bloqueio na concentração de 500 ng/mL e 250 ng/mL, respectivamente. Após incubação seguida de lavagem das placas, as mesmas foram incubadas com 100 μ L por poço de complexo estreptavidina-peroxidase (StrepAB - Dako Corporation) diluído em tampão de bloqueio, sob o abrigo da luz, por 30 minutos, a temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi revelada com 100 μ L por poço de solução de OPD (Sigma) e a reação interrompida com a adição de 50 μ L por poço de H₂SO₄ 2N. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA a 492 nm.

3.10 – Indução de EAE

Nos protocolos II e III, ratos Lewis foram imunizados com 50 μ L de uma emulsão contendo volumes iguais de proteína básica de mielina (MBP / Sigma)

diluída em salina (25 µg) e Adjuvante Completo de Freund contendo *Mycobacterium butyricum* (5 mg/mL).

3.11 – Avaliação do escore clínico

Os animais foram pesados e inspecionados quanto aos sinais clínicos da doença diariamente. A gravidade da doença foi definida segundo a seguinte escala: 0 = normal; 1 = cauda parcialmente frouxa; 2 = cauda frouxa; 3 = paraparesia moderada, perda da tonicidade do movimento; 4 = paraplegia; 5 = moribundo ou morte.

3.12 – Análise histopatológica

Para a análise histológica, as amostras de cérebro e medula espinhal (cervical, torácica e lombar) foram obtidas 20 dias após imunização com mielina. Fragmentos de cérebro e medula espinhal foram removidos e fixados em solução de formol tamponado 10% e embebida em Paraplast. Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E) segundo procedimento padrão. As análises foram analisadas em um microscópio Leica.

A comparação do processo inflamatório no SNC dos diferentes grupos foi feita através de inspeção visual. O critério utilizado para a escolha da região a ser documentada fotograficamente foi a de ser a mais inflamada em toda a lâmina a qual continha quatro cortes.

3.13 – Análise estatística

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média ± erro padrão da média (EPM) e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) seguida pela análise comparativa de Tukey. Para as variáveis não paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartilico e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows version 2.0 1995, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA.

*Protocolos Experimentais
e Resultados*

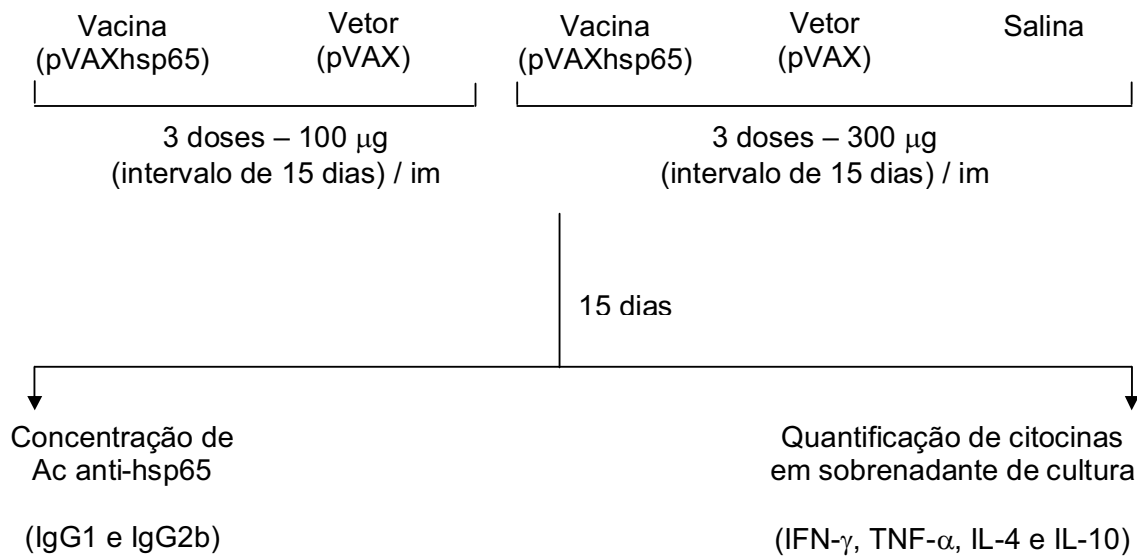
4 - Protocolos Experimentais e Resultados

Para atingir os três objetivos definidos anteriormente, utilizamos, respectivamente, os protocolos experimentais 1, 2 e 3, esquematizados a seguir. Com a intenção de facilitar o entendimento dos resultados, os mesmos serão sempre precedidos dos respectivos protocolos utilizados.

4.1 – Protocolo Experimental I

Objetivo: Caracterizar a resposta imune específica, humoral e celular, desencadeada pela vacina gênica para TB (DNAhsp65) em ratos Lewis.

Cinco grupos experimentais (3 a 5 animais por grupo).



4.1.1 – Resultados do Protocolo Experimental I

A. Resposta imune induzida pela vacinação com DNAhsp65

A produção de anticorpos específicos para hsp65 foi dependente da concentração de DNAhsp65 administrada. Somente a maior dose da vacina (300 µg) foi capaz de induzir níveis significativos de IgG2b. O vetor, mesmo na maior concentração, não induziu produção de anticorpo específico para hsp65.

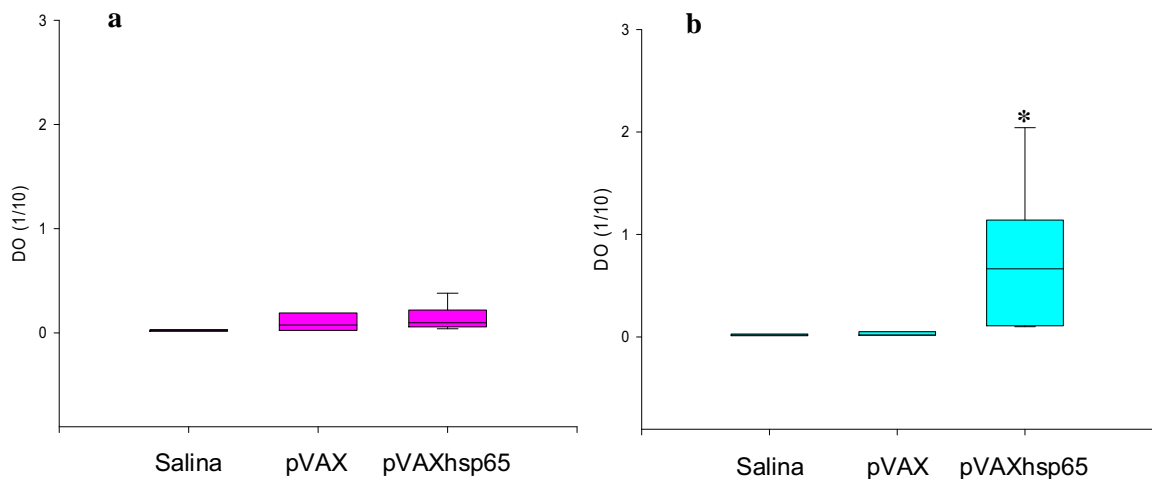


Figura 1: Produção de anticorpos em ratos Lewis imunizados com 300 µg de pVAXhsp65. As dosagens foram feitas por ELISA em amostras de soro diluídas 1/10. Os resultados da produção de IgG1 (a) e IgG2b (b) de animais imunizados com pVAXhsp65 representam a mediana (25 – 75%) de 3 a 5 animais por grupo.* $p < 0.05$ em comparação com os grupos salina e pVAX.

Não detectamos IL-4 e IL-10 nas culturas de células esplênicas de ratos imunizados com as doses de 100 µg ou 300 µg de pVAXhsp65 (dados não mostrados). No entanto, a produção de IFN- γ foi claramente dependente da dose de DNAhsp65. Em ratos imunizados com a menor concentração de DNA, os níveis de IFN- γ induzidos por rhsp65 foram discretamente maiores no grupo vacinado comparado aos grupos vetor e controle, mas essa diferença não foi significativa (dados não mostrados).

Em ratos imunizados com a maior dose da vacina, a produção de IFN- γ por células esplênicas após estimulação *in vitro* com rhsp65 foi significativamente maior nos animais vacinados em comparação com os animais inoculados com vetor ou salina (figura 2a).

A produção de IFN- γ induzida por estimulação de células esplênicas *in vitro* com ConA foi similar nos diversos grupos experimentais imunizados com a maior concentração de DNAhps65 (figura 2b).

Nas culturas celulares não estimuladas não houve produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 (dados não mostrados).

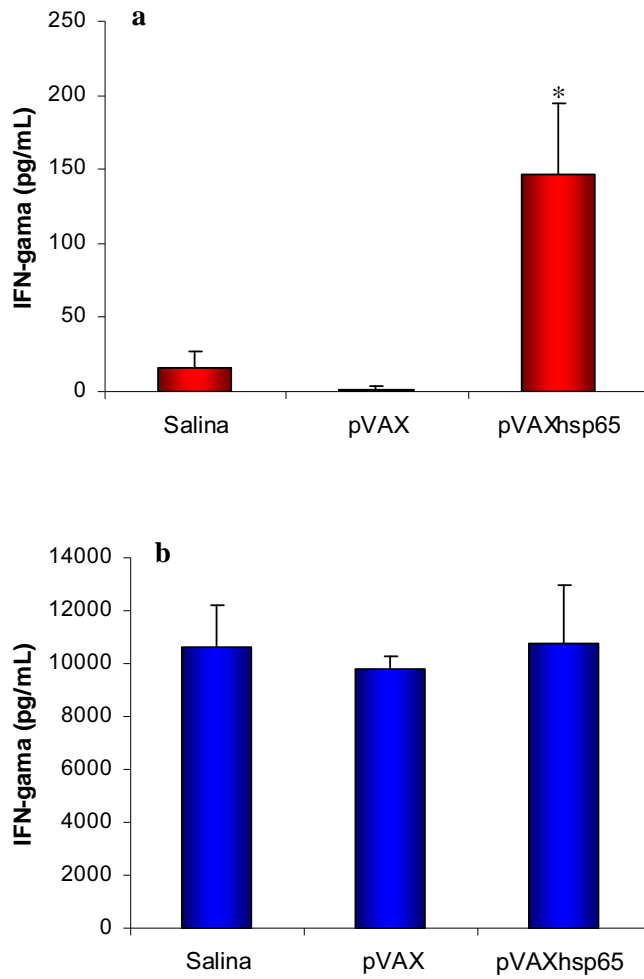


Figura 2: Produção de IFN- γ em ratos Lewis imunizados com 300 μ g de pVAXhsp65. As células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com rhsp65 (a) e ConA (b). Os resultados representam a média de 3 a 5 animais por grupo \pm erro padrão da média (EPM). * $p < 0.05$ em comparação com os grupos salina e pVAX.

Não houve produção de TNF- α por células esplênicas estimuladas *in vitro* com rhsp65 nos grupos imunizados com a menor dose de DNAhsp65 (dados não mostrados). Em ratos imunizados com a maior concentração de DNA, os níveis de TNF- α induzidos por rhsp65 permaneceram abaixo do nível de detecção do ensaio que é de 15 pg/mL (figura 3a).

Nos animais imunizados com a maior dose de DNAhsp65 a produção de TNF- α induzida por estimulação de células esplênicas *in vitro* com ConA foi similar nos diversos grupos experimentais (figura 3b). Já os níveis de TNF- α produzidos por células de linfonodo também estimuladas *in vitro* com ConA foram significativamente maiores no grupo vacinado comparado aos grupos vetor e salina (figura 3c).

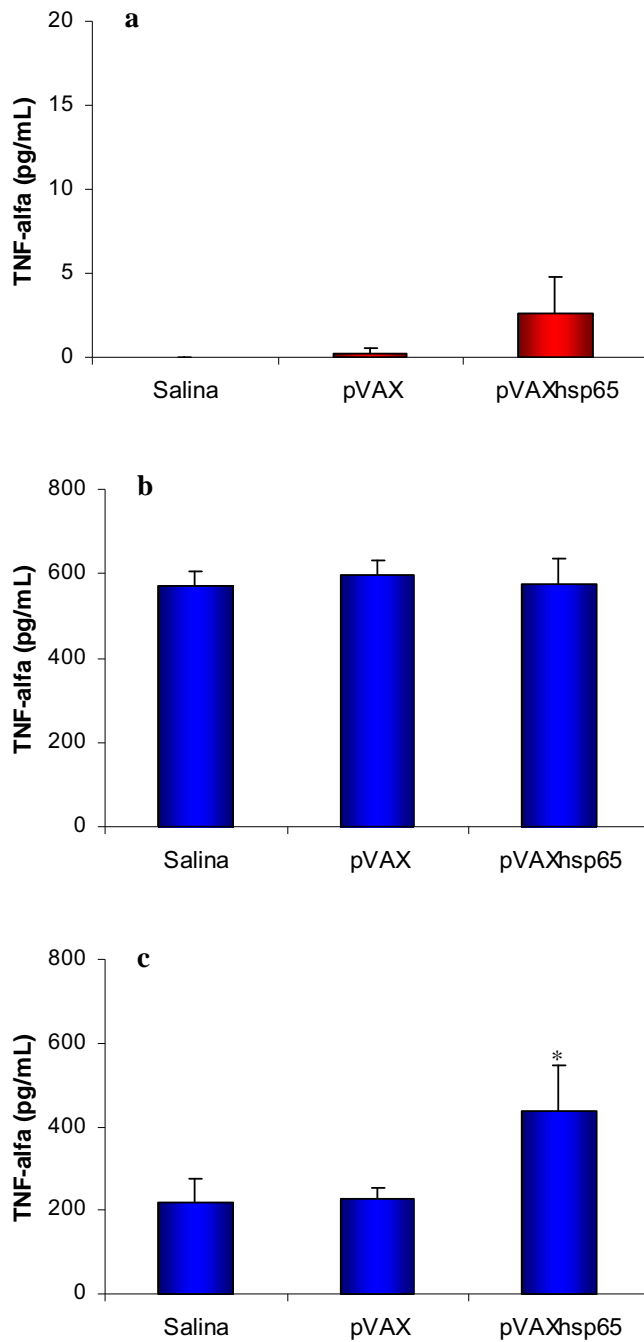


Figura 3: Produção de TNF- α em ratos Lewis imunizados com 300 μ g de pVAXhsp65. Células esplênicas estimuladas *in vitro* com rhsp65 (a) e ConA (b). Células de linfonodo estimuladas *in vitro* com ConA (c). Os resultados representam a média de 3 a 5 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação com os grupos salina e pVAX.

Em ratos imunizados com a maior concentração de DNA, não houve produção de IL-10 por células de linfonodo estimuladas *in vitro* com rhsp65 (dados não mostrados). Os níveis de IL-10 produzidos por estas células estimuladas *in vitro* com ConA foram discretamente maiores no grupo vacinado comparado ao grupo salina (figura 4).

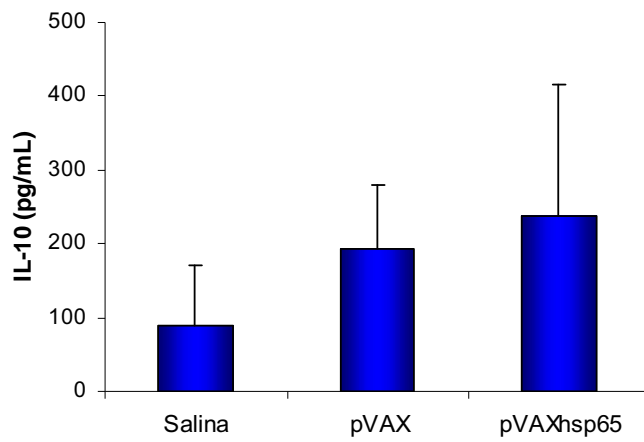
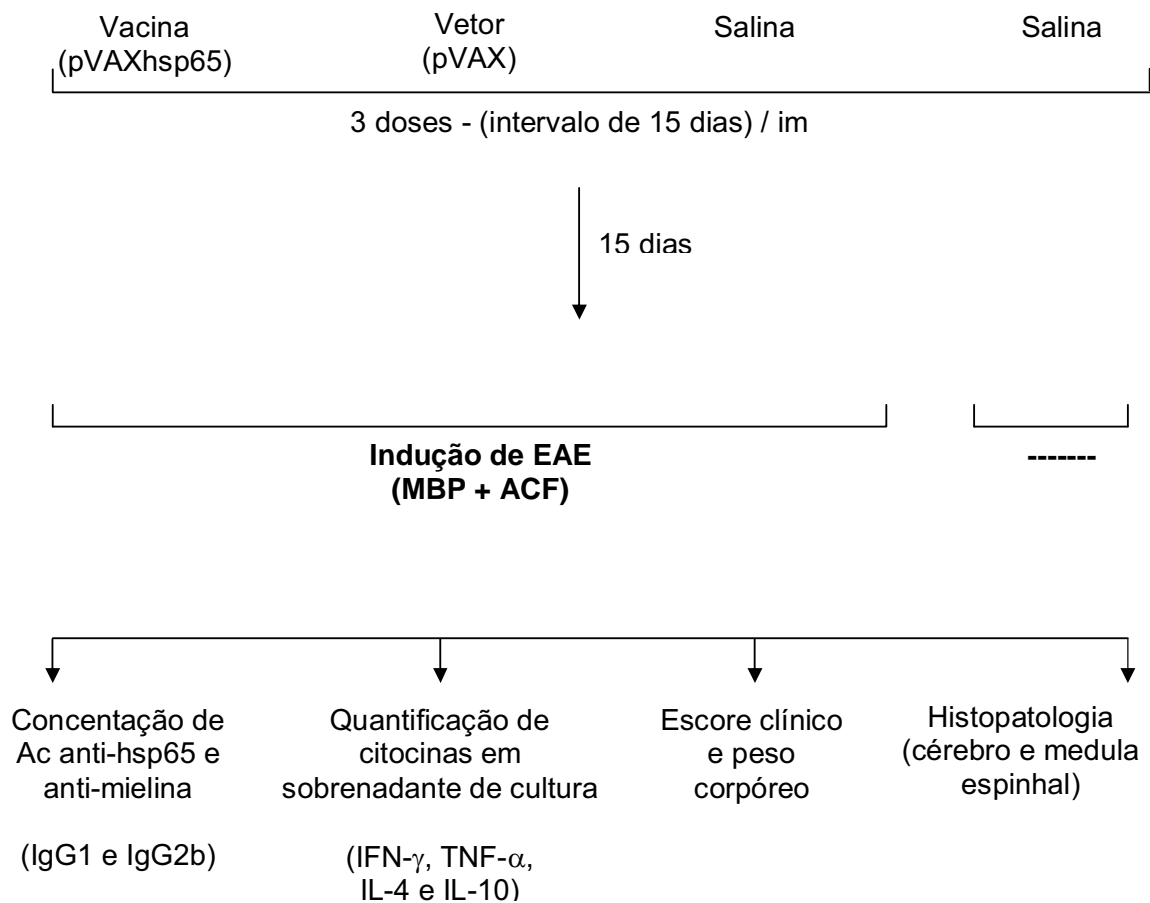


Figura 4: Produção de IL-10 em ratos Lewis imunizados com 300 µg de pVAXhsp65. As células de linfonodo foram estimuladas *in vitro* com ConA. Os resultados representam a média de 3 a 5 animais por grupo ± EPM.

4.2 – Protocolo Experimental II

Objetivo: Avaliar o efeito imunomodulador do protocolo clássico de imunização com DNAhsp65 (3 doses / via im) nas características clínicas, histológicas e imunológicas da EAE.

Cinco grupos experimentais (3 animais por grupo).



4.2.1 – Resultados do Protocolo Experimental II

A. Efeito da vacinação com DNAhsp65 na resposta imune anti-mielina

A imunização com mielina associada ao ACF desencadeou produção significativa de anticorpos específicos, tanto IgG1 quanto IgG2b. Os níveis de IgG1 foram significativamente mais elevados do que os de IgG2b específicos. A inoculação prévia de DNAhsp65 diminuiu significativamente os níveis de IgG1 mas não de IgG2b anti-mielina (figura 5).

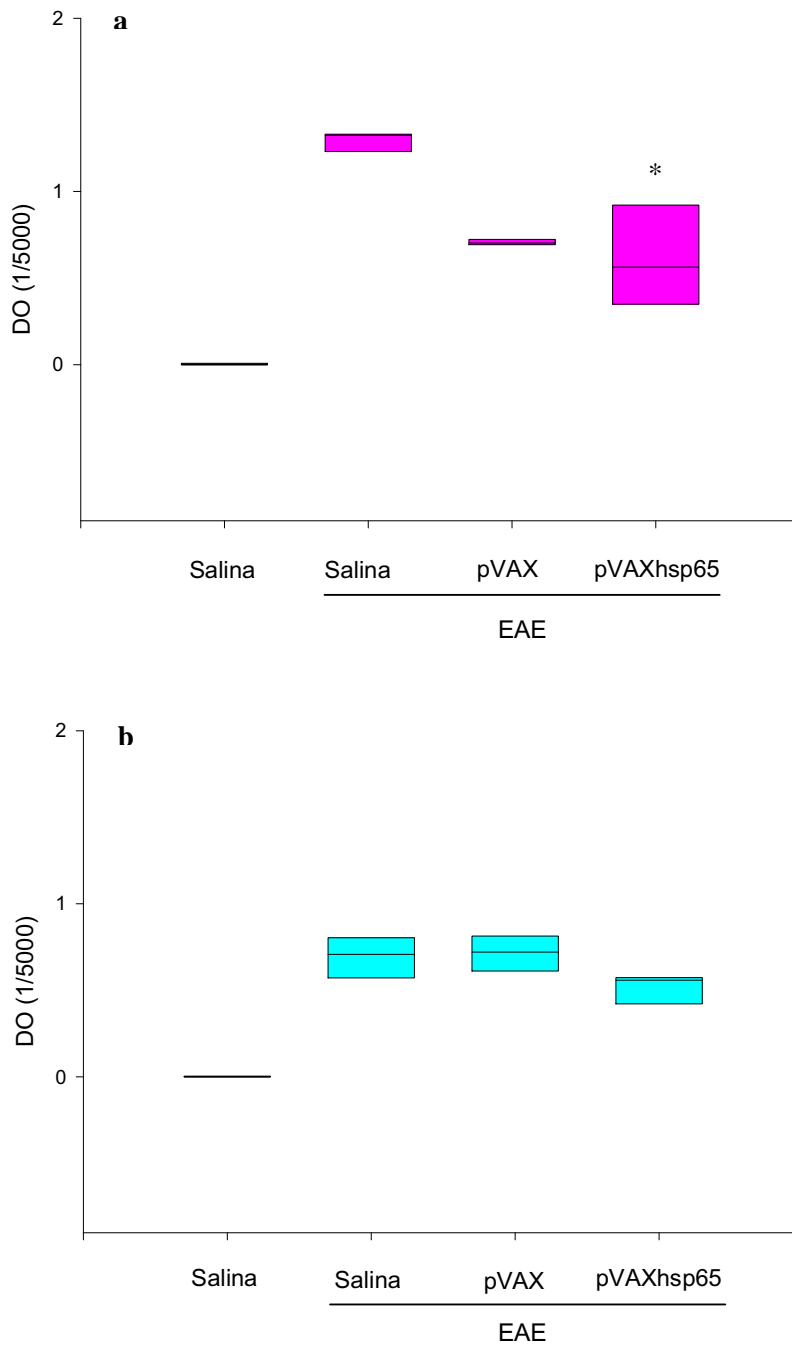


Figura 5: Efeito da imunização prévia com pVAXhsp65 na produção de IgG1 (a) e IgG2b (b) anti-mielina. As dosagens foram feitas por ELISA em amostras de soro diluídas 1/5000. Os resultados representam a mediana (25 – 75%) de 3 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação com o grupo salina.

A produção de IFN- γ por células esplênicas oriundas de animais com EAE, reestimuladas *in vitro* com mielina é significativa, comparativamente ao grupo controle (sem EAE), mas não é afetada pela inoculação prévia de vetor ou vacina (figura 6a). Após reestímulo *in vitro* destas células com ConA também se observa produção significativa de IFN- γ , como esperado. Porém a inoculação prévia de vetor ou vacina diminuiu significativamente estes níveis de IFN- γ . É importante ressaltar, entretanto, que os níveis de IFN- γ produzidos por células esplênicas de animais com EAE já são menores do que os níveis desta citocina detectados em animais do grupo controle, ou seja, sem EAE (figura 6b).

Quanto à produção de TNF- α por animais submetidos à indução de EAE, observamos uma baixa detecção desta citocina em culturas de células esplênicas estimuladas *in vitro* com mielina. Além disso, a inoculação prévia de pVAX ou pVAXhsp65 não alterou a produção dessa citocina (figura 7a). Já em culturas estimuladas com ConA, os animais previamente imunizados com DNAhsp65 apresentaram uma diminuição discreta, porém não significativa dos níveis de TNF- α (figura 7b).

A inoculação de mielina associada ao ACF também desencadeou produção significativa de IL-10 por células de linfonodo estimuladas *in vitro* com mielina ou ConA. A imunização prévia com DNAhsp65, nesses animais submetidos à indução de EAE, reduziu os níveis desta citocina tanto em culturas estimuladas com mielina (figura 8a) quanto com ConA (figura 8b).

Nas culturas celulares não estimuladas não ocorreu produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 (dados não mostrados).

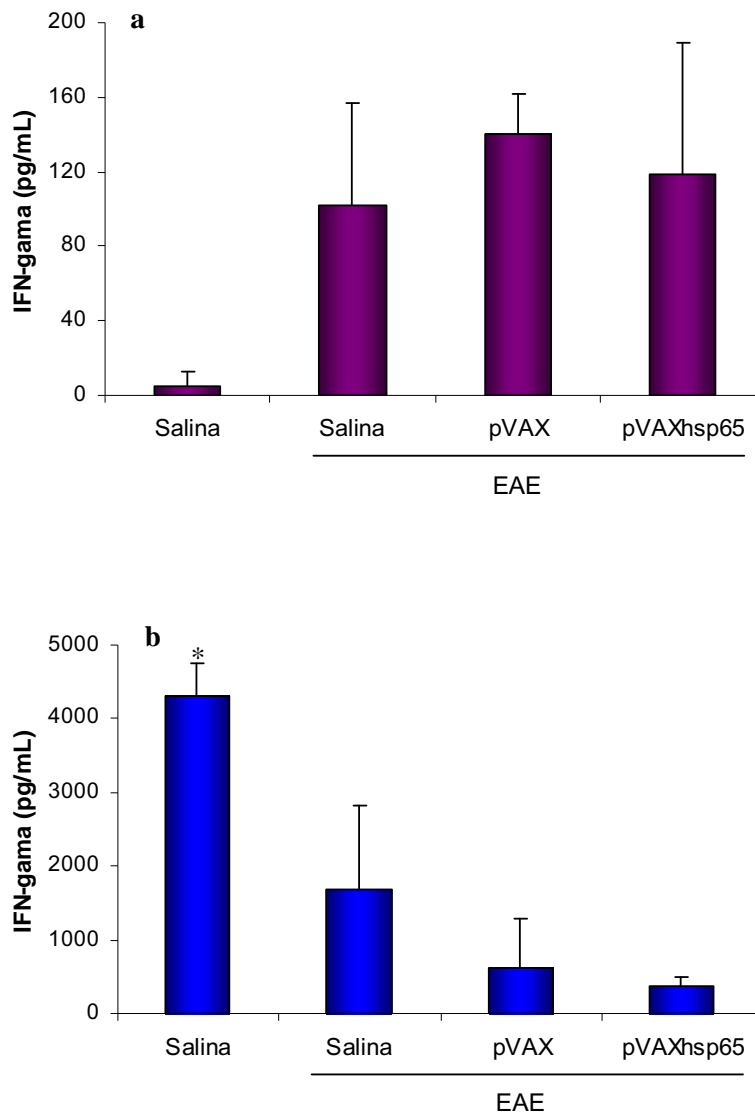


Figura 6: Efeito da imunização prévia com pVAXhsp65 na produção de IFN- γ em ratos Lewis submetidos à indução de EAE. Células esplênicas estimuladas *in vitro* com mielina (a) e ConA (b). Os resultados representam a média de 3 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação com os grupos com EAE.

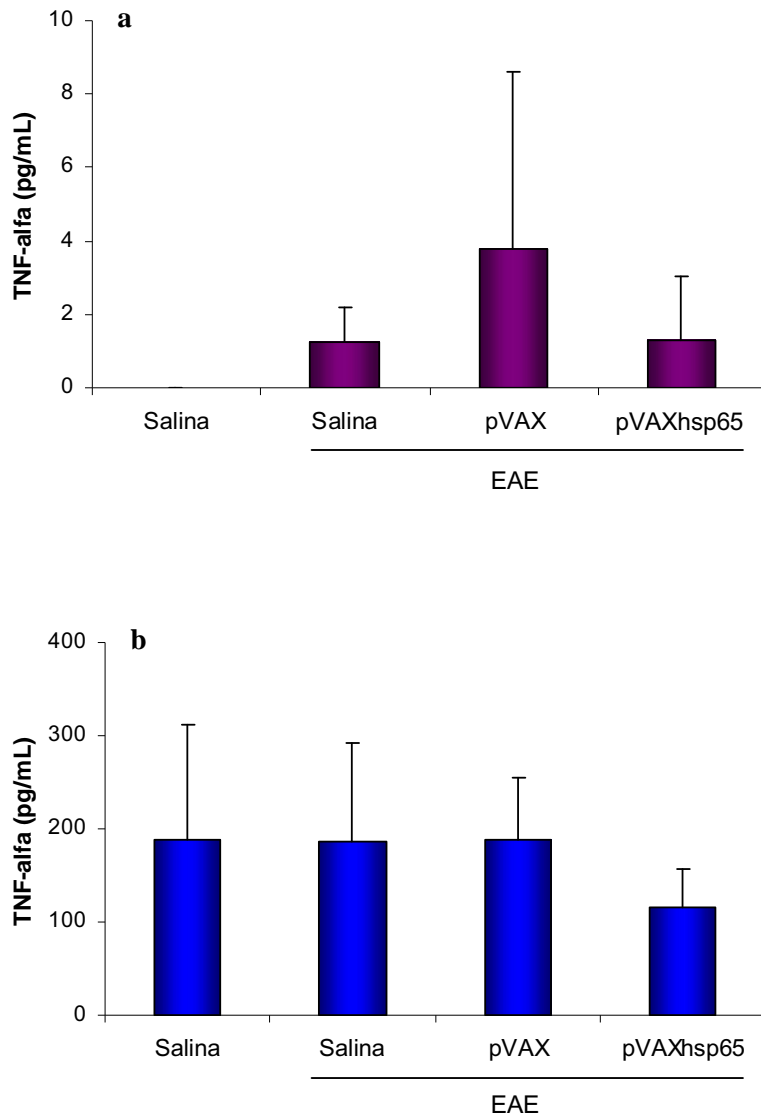


Figura 7: Efeito da imunização prévia com pVAXhsp65 na produção de TNF- α em ratos Lewis submetidos à indução de EAE. Células esplênicas estimuladas *in vitro* com mielina (a) e ConA (b). Os resultados representam a média de 3 animais por grupo \pm EPM.

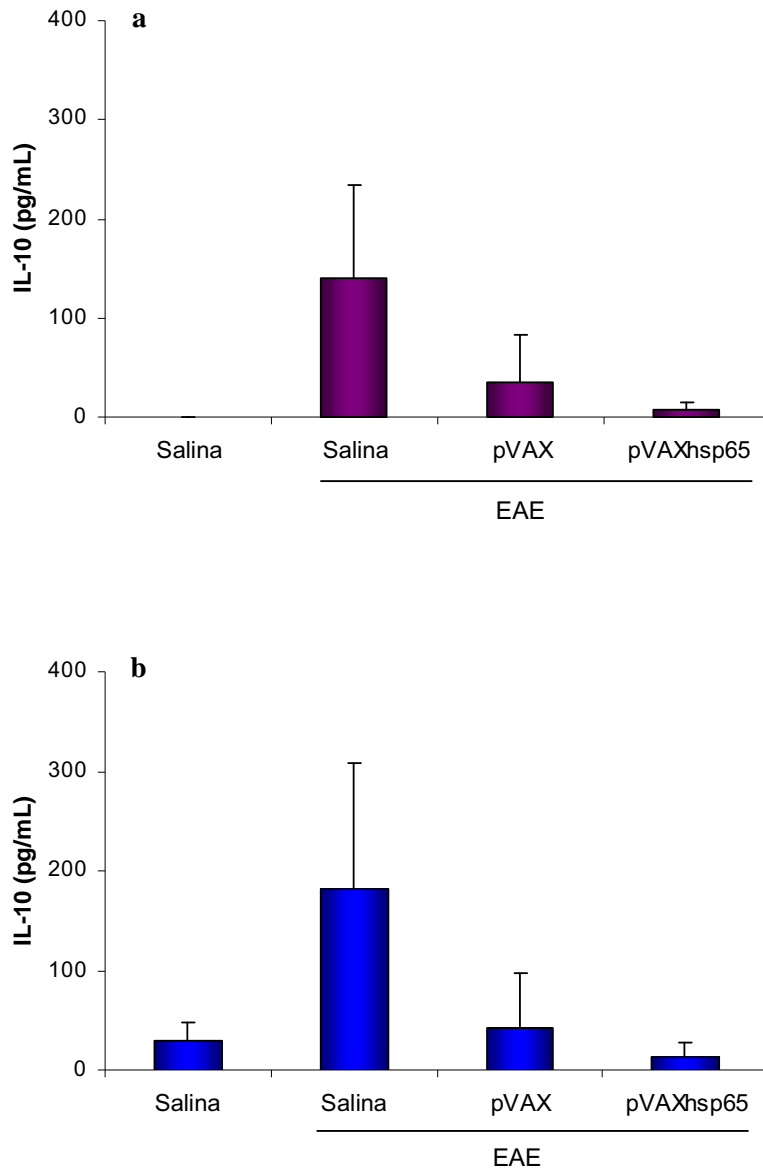


Figura 8: Efeito da imunização prévia com pVAXhsp65 na produção de IL-10 em ratos Lewis submetidos à indução de EAE. Células de linfonodo estimuladas *in vitro* com mielina (a) e ConA (b). Os resultados representam a média de 3 animais por grupo \pm EPM.

B. Efeito da vacinação com DNAhsp65 no desenvolvimento clínico da EAE

A vacinação prévia com DNAhsp65 não afetou a perda de peso dos animais com EAE, tanto na fase aguda quanto na fase de remissão da doença (figura 9a). A porcentagem de perda de peso foi similar nos diferentes grupos com EAE, ocorrendo perda de 10 a 15%, enquanto que os animais controle (sem EAE) tiveram um ganho de peso de 1 a 4% (figura 9b).

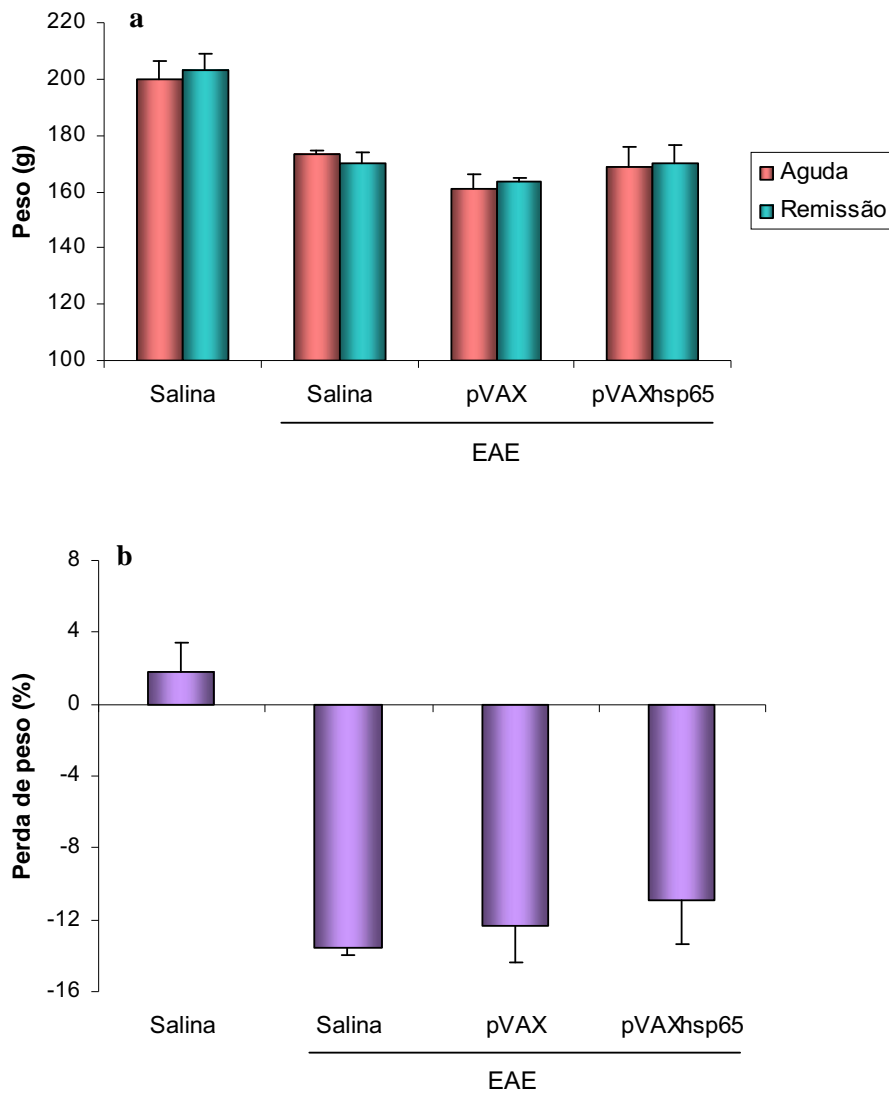


Figura 9: Efeito da DNAhsp65 na evolução do peso corpóreo de ratos Lewis submetidos à indução de EAE, por inoculação de MBP emulsificada em ACF. O peso corpóreo foi avaliado diariamente. O pico da fase aguda ocorreu no 14º dia após a indução da EAE, período correspondente ao escore clínico médio máximo. A fase de remissão ocorreu no 20º dia após a indução da EAE, período correspondente ao desaparecimento da sintomatologia clínica. Média do peso dos animais \pm EPM (a). Média da porcentagem de perda de peso dos animais \pm EPM (b).

A vacinação prévia com DNAhsp65 não afetou claramente a progressão do escore clínico dos animais com EAE (figura 10). Todos os animais tratados com salina chegaram ao escore 3. Entre os animais previamente imunizados com vetor, 1 animal alcançou o escore 4, 1 animal atingiu o escore 3 e 1 animal chegou apenas ao escore 2. Já nos animais imunizados com vacina, apenas 1 animal atingiu o escore 3 e dois animais restantes alcançaram o escore 2.

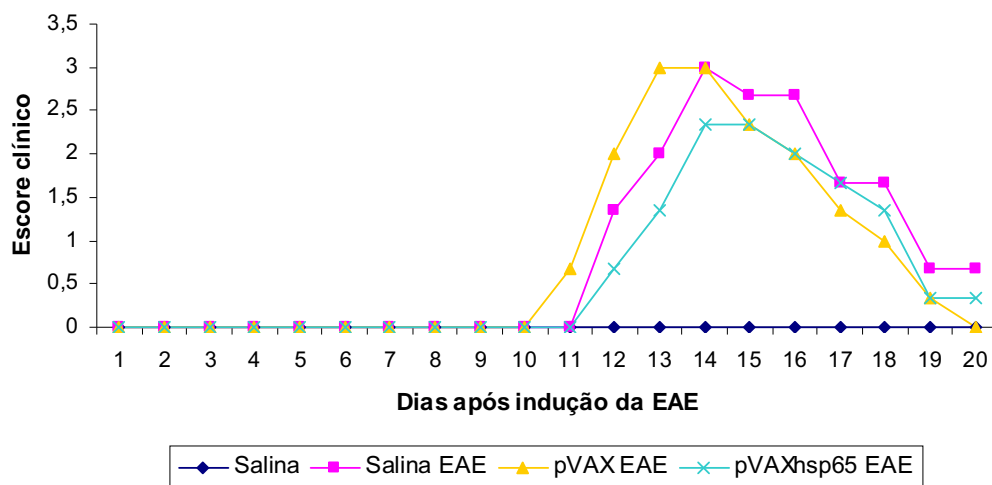


Figura 10: Efeito da DNAhsp65 no escore clínico de ratos Lewis submetidos à indução de EAE, por inoculação de MBP emulsificada em ACF. O escore clínico dos animais foi avaliado diariamente, através do grau de paralisia dos membros posteriores, que variam de 0 (animal normal) a 4 (paraplegia ou tetraplegia). Média de 3 animais por grupo.

C. Efeito da vacinação com DNAhsp65 no infiltrado inflamatório presente no cérebro e medula espinhal

Os cérebros dos animais do grupo controle positivo, isto é, somente submetidos à indução de EAE, apresentaram focos inflamatórios típicos compostos por células mononucleares com localização perivascular. Além disso, observamos vasodilatação e presença de eritrócitos no interior dos vasos. Já os cortes de cérebro dos animais previamente imunizados com vetor ou vacina não apresentaram esses focos inflamatórios perivasculares, mantendo uma estrutura similar a dos animais sem o desenvolvimento de EAE (figura 11).

As diversas porções da medula espinhal (cervical, torácica e lombar) dos animais do grupo controle positivo também apresentaram focos inflamatórios típicos, compostos predominantemente por células mononucleares localizadas ao redor dos vasos, além de vasodilatação e presença de eritrócitos no interior dos mesmos. Nos cortes de medula cervical (figura 12) e torácica (figura 13) dos animais do grupo controle positivo observamos presença de células mononucleares tanto ao redor dos vasos, quanto dispersas pelo tecido. Nos animais previamente inoculados com vetor ou vacina, o infiltrado inflamatório foi menos intenso e restrito ao redor dos vasos sanguíneos. Nos cortes de medula lombar, somente a imunização prévia com DNAhsp65 reduziu discretamente o infiltrado inflamatório perivascular (figura 14).

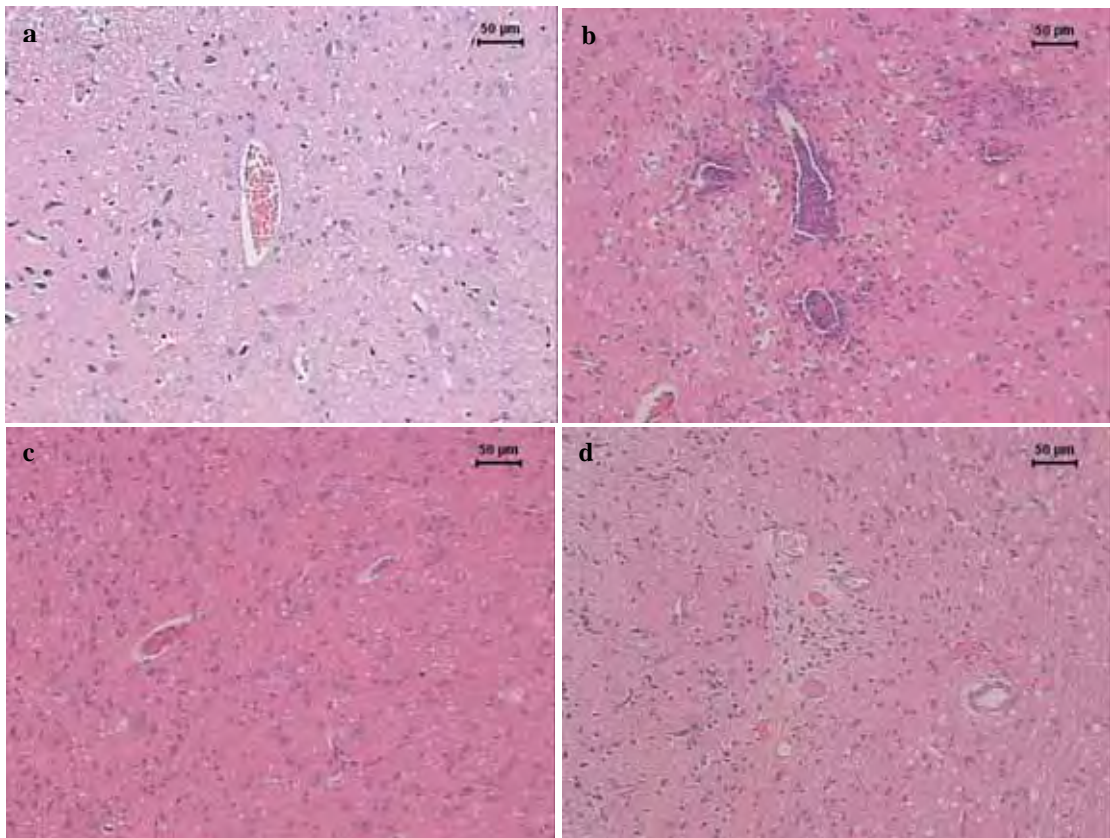


Figura 11: Efeito da inoculação prévia de pVAX e pVAXhsp65 no cérebro de animais submetidos à indução de EAE, por inoculação de MBP emulsificada em ACF. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório no cérebro de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo vetor / EAE (c) e do grupo vacina / EAE (d). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

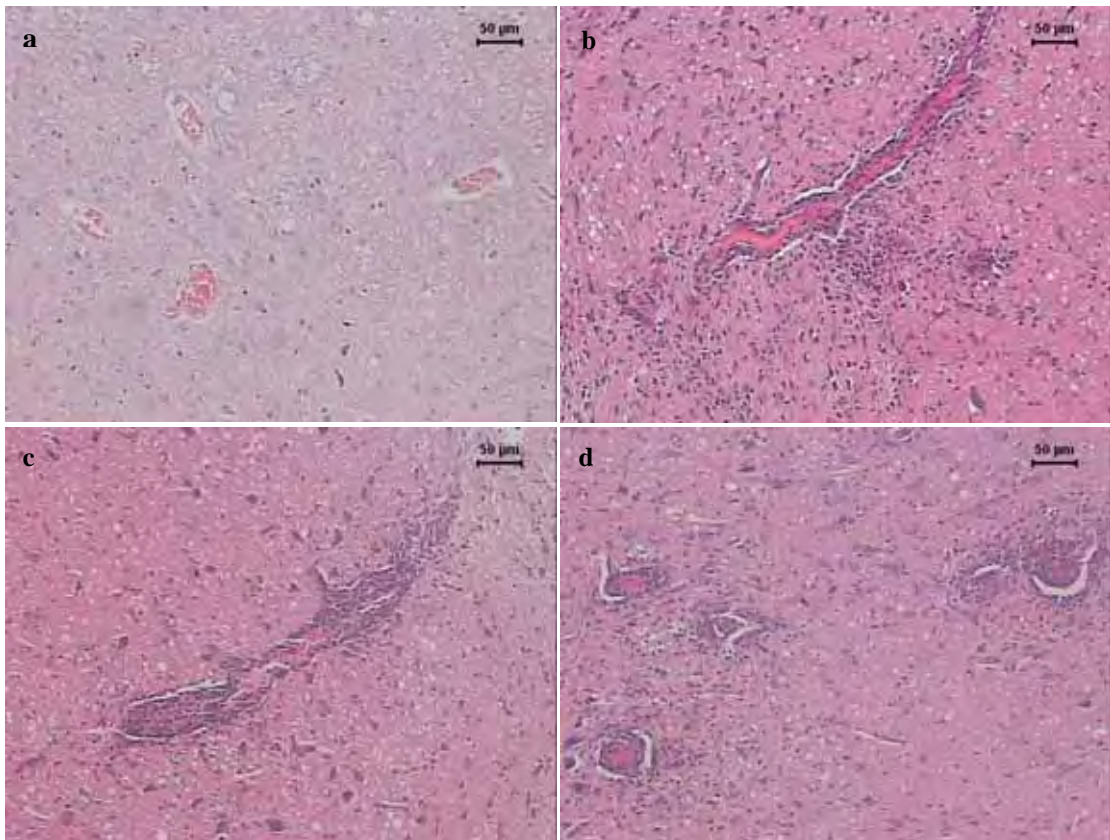


Figura 12: Efeito da inoculação prévia de pVAX e pVAXhsp65 na porção cervical da medula espinhal de animais submetidos à indução de EAE, por inoculação de MBP emulsificada em ACF. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório na medula cervical de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo vetor / EAE (c) e do grupo vacina / EAE (d). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

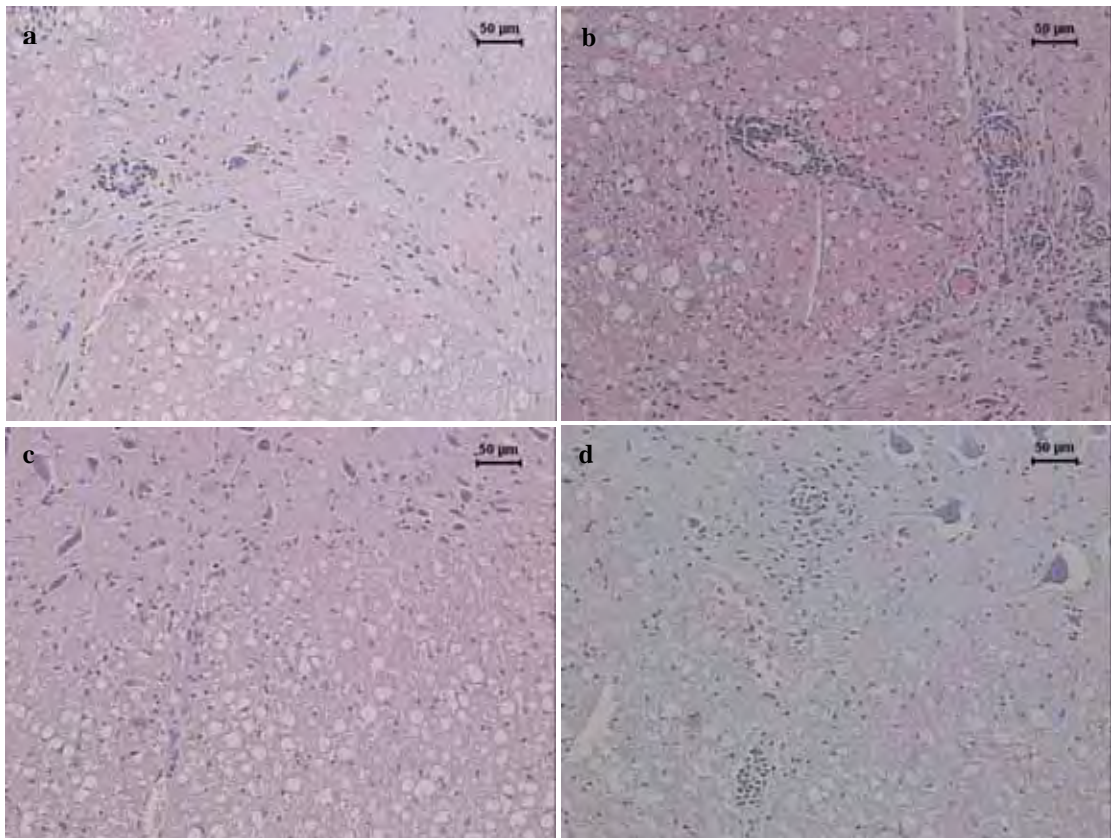


Figura 13: Efeito da inoculação prévia de pVAX e pVAXhsp65 na porção torácica da medula espinhal de animais submetidos à indução de EAE, por inoculação de MBP emulsificada em ACF. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório na medula torácica de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo vetor / EAE (c) e do grupo vacina / EAE (d). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

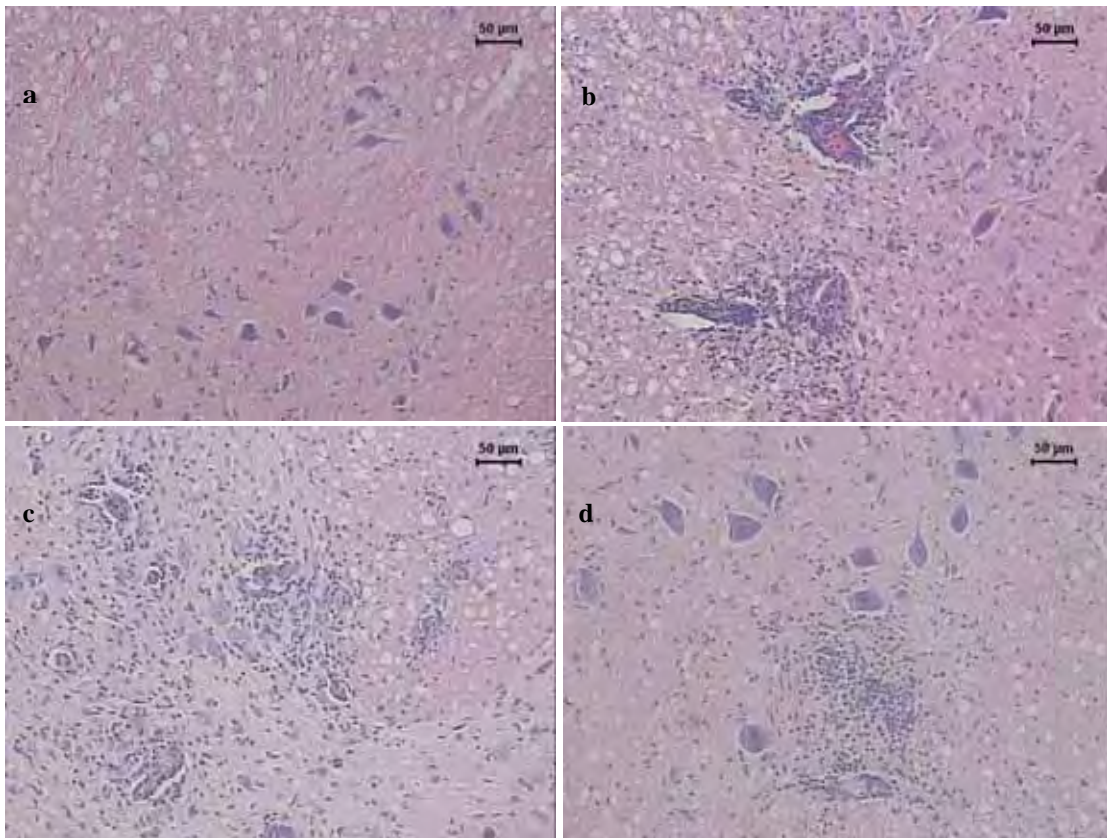


Figura 14: Efeito da inoculação prévia de pVAX e pVAXhsp65 na porção lombar da medula espinhal de animais submetidos à indução de EAE, por inoculação de MBP emulsificada em ACF. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório na medula lombar de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo vetor / EAE (c) e do grupo vacina / EAE (d). Cortes de 5 μm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

D. Modulação da resposta imune anti-hsp65 pela indução de EAE

Conforme demonstrado no protocolo experimental I, houve produção significativa de IgG2b específico para rhsp65 somente nos animais imunizados com 300 µg de vacina. A imunização posterior com mielina associada ao ACF alterou esse padrão de produção de anticorpos. Neste caso, observamos maior produção, apesar de não significativa, tanto de IgG1 (figura 15b) quanto de IgG2b (figura 15d) anti-hsp65 no grupo previamente imunizado com pVAXhsp65.

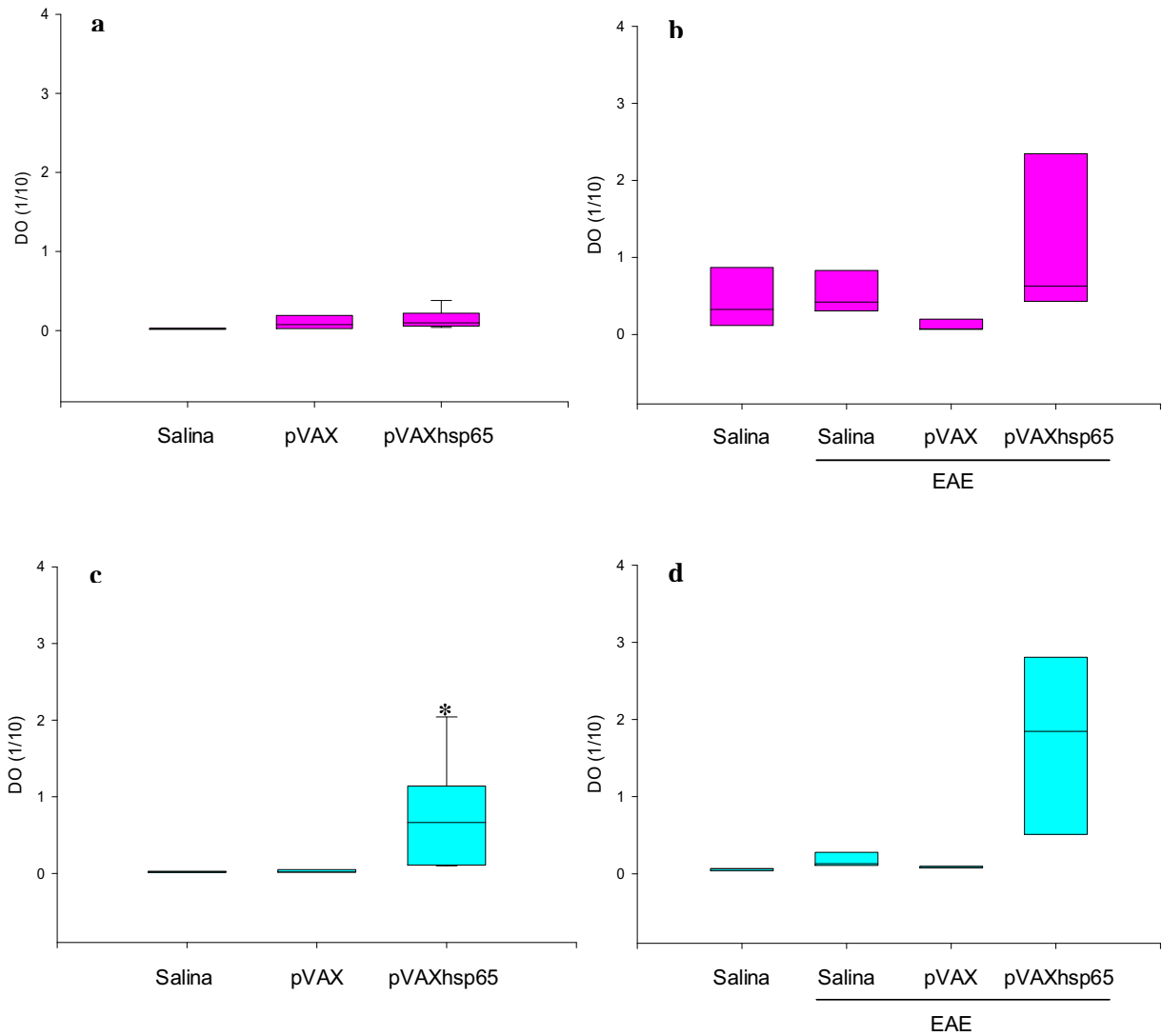


Figura 15: Efeito da imunização com mielina associada ao ACF na produção de anticorpos IgG1 (b) e IgG2b (d) anti-hsp65. Produção de IgG1 (a) e IgG2b (c) em ratos Lewis imunizados com 300 µg de pVAXhsp65. As dosagens foram feitas por ELISA em amostras de soro diluídas 1/10. Os resultados representam a mediana (25 – 75%) de 3-5 animais por grupo.

As citocinas IL-4, IL-10 e TNF- α não foram detectadas em culturas de células esplênicas de ratos previamente imunizados pVAXhsp65. O processo posterior de indução de EAE não alterou estes resultados (dados não mostrados).

Como demonstrado no protocolo experimental I, células esplênicas de animais imunizados com pVAXhsp65 produziram níveis significativos de IFN- γ quando re-estimuladas com rhsp65 (figura 16a). A posterior indução de EAE reduziu significativamente os níveis dessa citocina (figura 16b)

Em animais imunizados com pVAXhsp65, não houve detecção de IL-10 em cultura de células de linfonodo re-estimuladas com rhsp65 (dados não mostrados). Entretanto, células de linfonodo de animais com EAE produziram altos níveis de IL-10. Devemos ressaltar o fato da produção desta citocina ser significativamente menor em animais com EAE, os quais foram previamente imunizados com pVAXhsp65 (figura 17a).

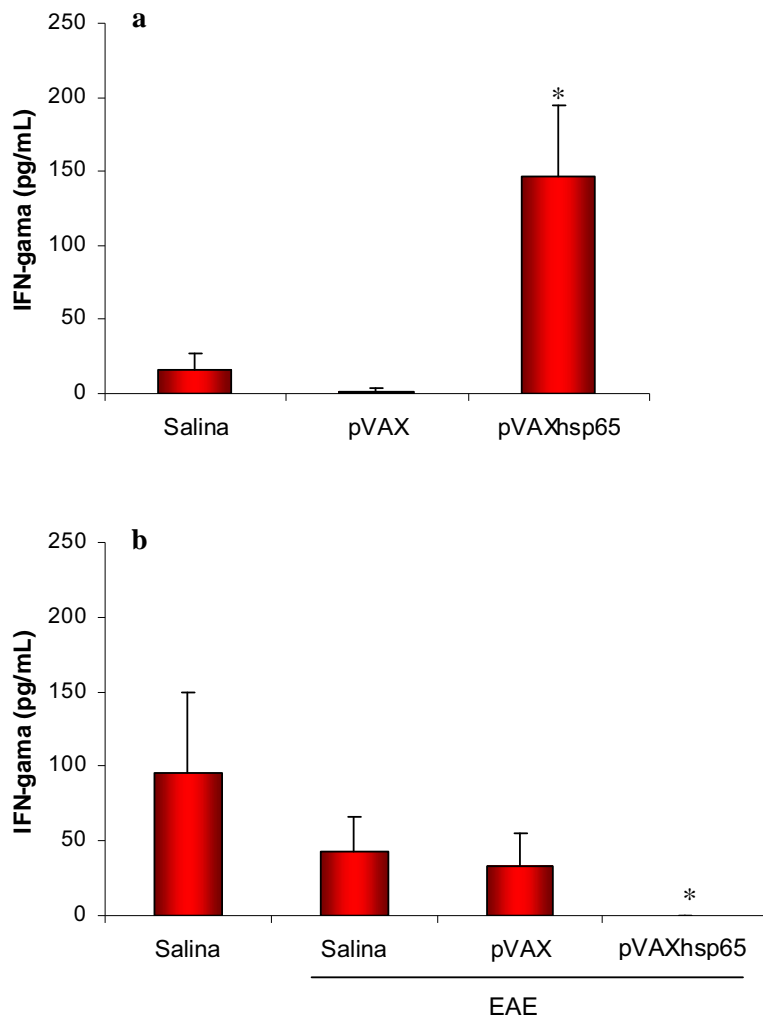


Figura 16: Efeito da imunização com mielina associada ao ACF na produção de IFN- γ especificamente induzida por rhsp65. Células esplênicas de animais somente imunizados com pVAXhsp65 (a) e células esplênicas de animais previamente imunizados com pVAXhsp65 e submetidos à indução de EAE (b). Os resultados representam a média de 3-5 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação com os grupos salina e pVAX.

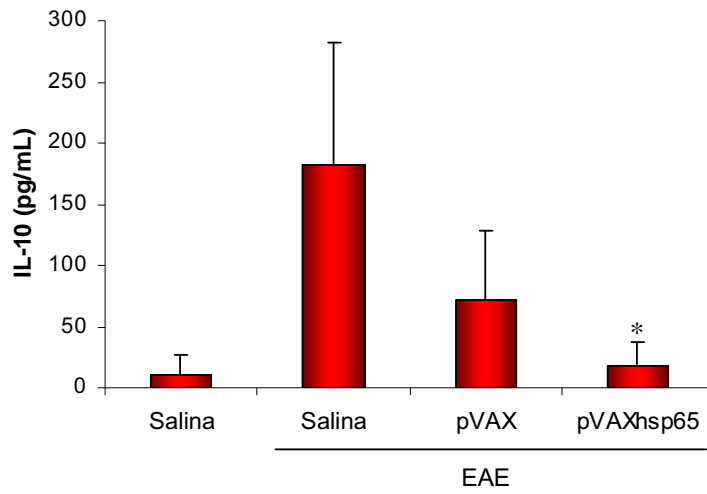
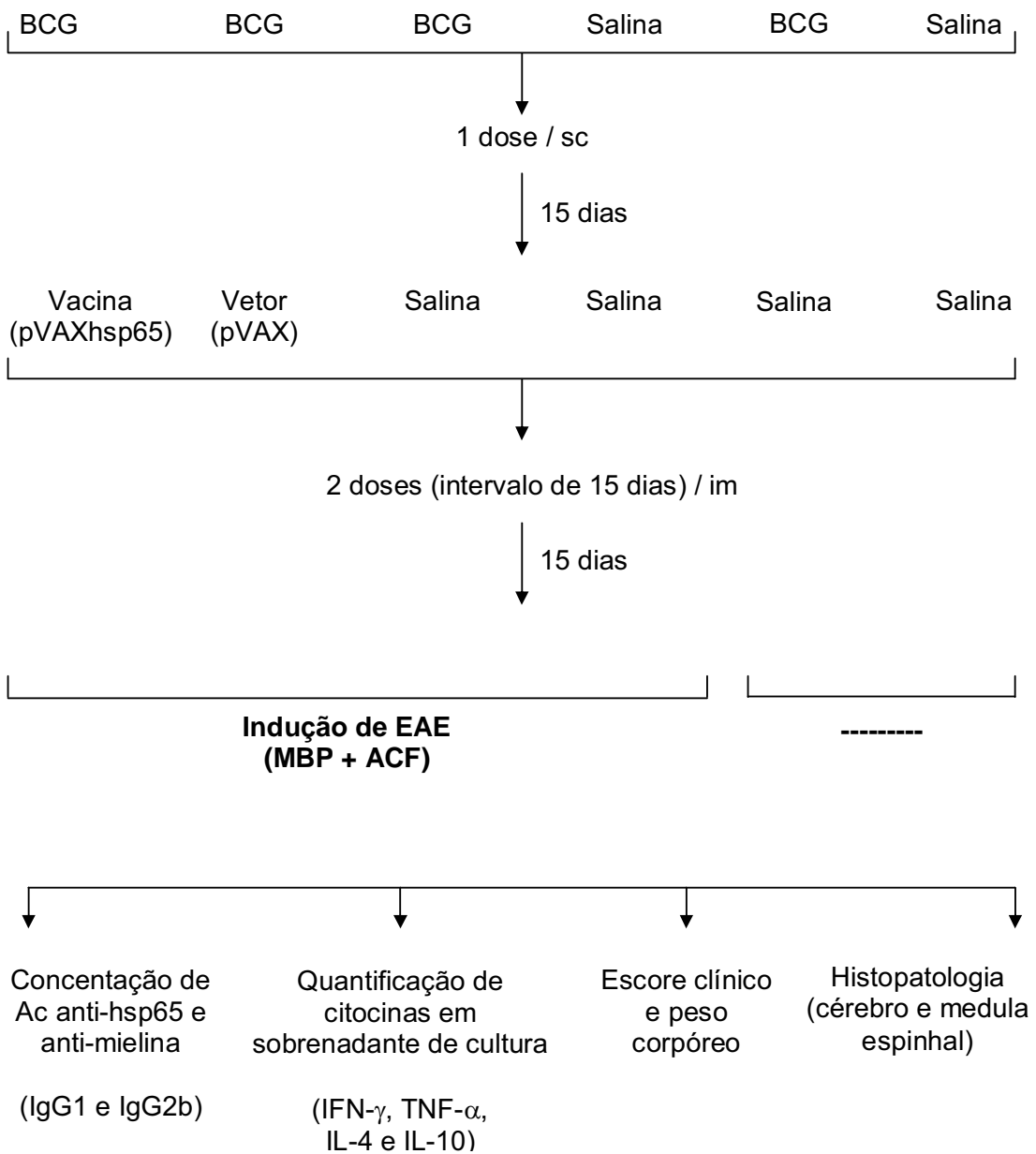


Figura 17: Efeito da imunização com mielina associada ao ACF na produção de IL-10 especificamente induzida por rhsp65. Células de linfonodo de animais previamente imunizados com pVAXhsp65 e submetidos à indução de EAE. Os resultados representam a média de 3-5 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação com os grupos salina e pVAX.

4.3 – Protocolo Experimental III

Objetivo: Avaliar o efeito imunomodulador da estratégia vacinal: BCG (subcutânea) / DNAhsp65 (2 doses / via im), nas características clínicas, histológicas e imunológicas da EAE.

Seis grupos experimentais (5 a 6 animais por grupo).



4.3.1 – Resultados do Protocolo Experimental III

A. Imunogenicidade do BCG

A avaliação da produção de citocinas por células de animais imunizados com BCG indica que este procedimento determinou alterações condizentes com ativação imunológica tanto específica quanto não específica. Células esplênicas dos animais imunizados produziram maior quantidade de IFN- γ quando estimuladas *in vitro* com ConA (figura 18a) ou com rhsp65 (figura 18c), sendo que neste último caso o aumento foi significativo. Células oriundas de linfonodos de animais imunizados e estimuladas *in vitro* com ConA também produziram níveis significativamente mais elevados de IL-10 comparativamente aos animais do grupo controle, ou seja, injetados com salina (figura 18b).

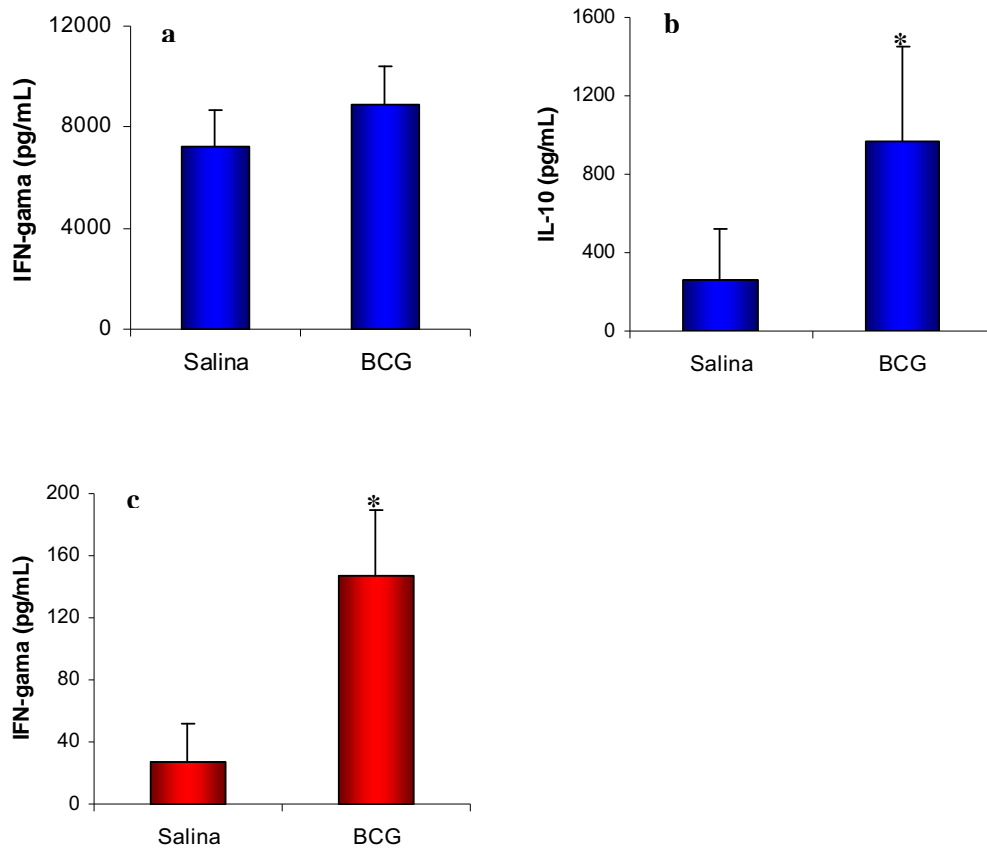


Figura 18: Efeito da imunização com BCG na produção das citocinas: IFN- γ (a e c) e IL-10 (b). Células esplênicas estimuladas *in vitro* com ConA (a) ou rhsp65 (c) e células de linfonodo estimuladas *in vitro* com ConA (b). Os resultados representam a média de 5 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação com o grupo salina.

B. Imunogenicidade da DNAhsp65

É importante ressaltar que a imunogenicidade da DNAhsp65 associada com 2 doses desta vacina, como foi o caso deste protocolo, não foi testada separadamente. Portanto, os resultados aqui apresentados foram avaliados na fase de recuperação da EAE, ou seja, após a imunização com mielina associada ao ACF, podendo, portanto, ter sofrido interferência desta imunização.

A imunogenicidade da DNAhsp65 foi testada através da avaliação da produção de anticorpos e de algumas citocinas após estímulo *in vitro* com rhsp65. Anticorpos de classe IgG1 específicos para hsp65 foram detectados tanto nos animais imunizados com BCG quanto com BCG / DNAhsp65. Apesar destes níveis serem mais elevados no grupo BCG / DNAhsp65, esta diferença não foi estatisticamente significativa (figura 19a). Por outro lado, anticorpos IgG2b anti-hsp65 estavam presentes somente no grupo BCG / DNAhsp65, atestando a imunogenicidade da vacina gênica utilizada (figura 19b).

Níveis mais elevados de IFN- γ (figura 20a) e IL-10 (figura 20b) foram detectados em culturas de células de baço e linfonodo, respectivamente, re-estimuladas *in vitro* com rhsp65. Entretanto, este aumento não foi significativo.

Por razões metodológicas, a detecção de IL-10 só foi possível em culturas de células de linfonodo.

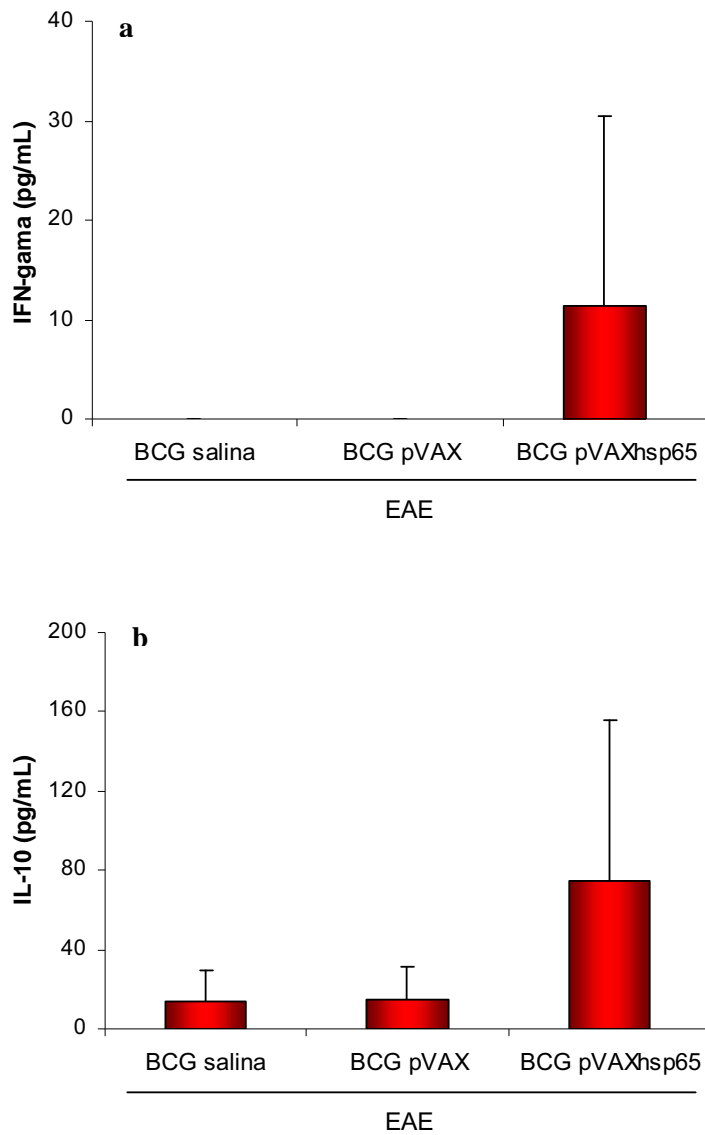


Figura 20: Produção de IFN- γ (a) e IL-10 (b) em ratos Lewis imunizados com BCG e pVAXhsp65 e posteriormente submetidos à indução de EAE. Células esplênicas (a) e células de linfonodo (b) foram estimuladas *in vitro* com rhsp65. Os resultados representam a média de 5 a 6 animais por grupo \pm EPM.

C. Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 na resposta imune anti-mielina

O possível efeito modulador das imunizações com BCG e DNAhsp65 sobre a resposta imune específica para mielina foi avaliado pelo nível das subclasses IgG1 e IgG2b específicas e pela produção de IFN- γ pelo baço e IL-10 pelos linfonodos após estímulo *in vitro* com MBP. A inoculação prévia de DNAhsp65, mas não a de BCG, determinou aumento não significativo nos níveis de IgG1 anti-mielina (figura 21a). Tanto o BCG quanto a DNAhsp65 diminuíram de forma discreta, não significativa, os níveis de IgG2b anti-mielina (figura 21b). Para facilitar o entendimento deste efeito, a relação entre os níveis de IgG1 e IgG2b nos diferentes grupos, é mostrada na figura 21c, indicando que só a imunização com DNAhsp65 foi capaz de aumentar os níveis de IgG1.

A inoculação prévia de BCG modulou de forma similar a produção de IFN- γ pelo baço e IL-10 pelos linfonodos (figuras 22a e 22b, respectivamente). Nos dois casos, após estímulo com mielina, ocorreu menor produção, embora não tenha sido estatisticamente significativa, destas duas citocinas. No grupo inoculado com BCG e DNAhsp65 este efeito inibidor foi similar.

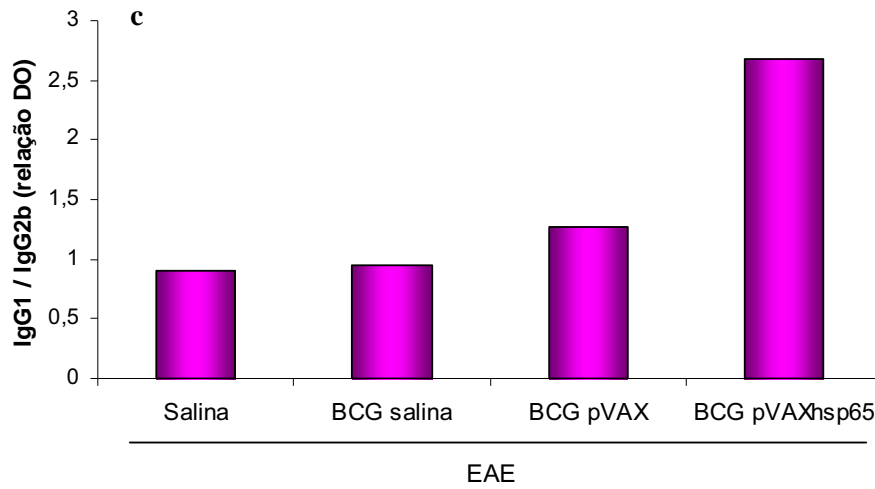


Figura 21: Efeito da estratégia BCG / pVAXhsp65 na produção de anticorpos anti-mielina em ratos Lewis submetidos à indução de EAE. As dosagens foram feitas por ELISA em amostras de soro diluídas 1/5000 e 1/1000 para a análise de IgG1 (a) e IgG2b (b), respectivamente. A relação IgG1 / IgG2b está representada na figura 21c. Os resultados representam a mediana (25 – 75%) de 5-6 animais por grupo.

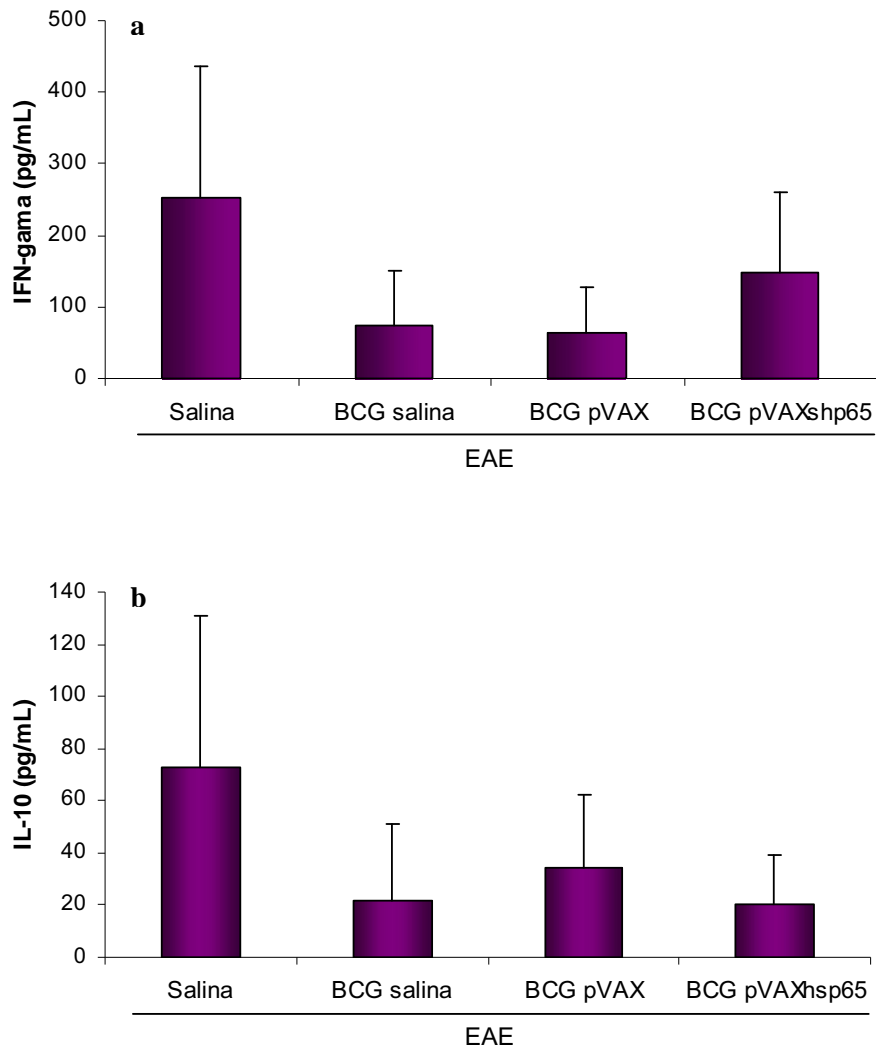


Figura 22: Efeito da estratégia BCG / pVAXhsp65 na produção de IFN- γ (a) e IL-10 (b) em ratos Lewis submetidos à indução de EAE. Células esplênicas (a) e células de linfonodo (b) estimuladas *in vitro* com mielina. Os resultados representam a média de 5-6 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0.05$ em comparação com os grupos com EAE.

D. Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 sobre o desenvolvimento da EAE

O desenvolvimento da EAE foi acompanhado através de três parâmetros distintos: perda de peso, escore clínico e intensidade do processo inflamatório no SNC (cérebro e diferentes regiões da medula espinhal: cervical, torácica e lombar).

Os animais dos dois grupos controle (salina e BCG) não perderam peso. Ao contrário, e como esperado, estes animais ganharam peso no decurso do experimento (figura 23a). Os quatro grupos experimentais submetidos à indução de EAE, independentemente do protocolo da vacinação prévia aplicada, perderam peso (7 a 12%). Apesar desta perda de peso ter sido menor nos grupos que receberam pVAX / BCG ou pVAXhsp65 / BCG (7 a 8%), a mesma não diferiu estatisticamente dos grupos salina e salina / BCG.

Em relação ao escore clínico, não foram observadas diferenças importantes entre os grupos. Os sintomas clínicos foram observados a partir dos dias 9 ou 10 após a inoculação de mielina. O escore máximo foi similar e a fase de recuperação também ocorreu em período similar nos diferentes grupos (figura 23b).

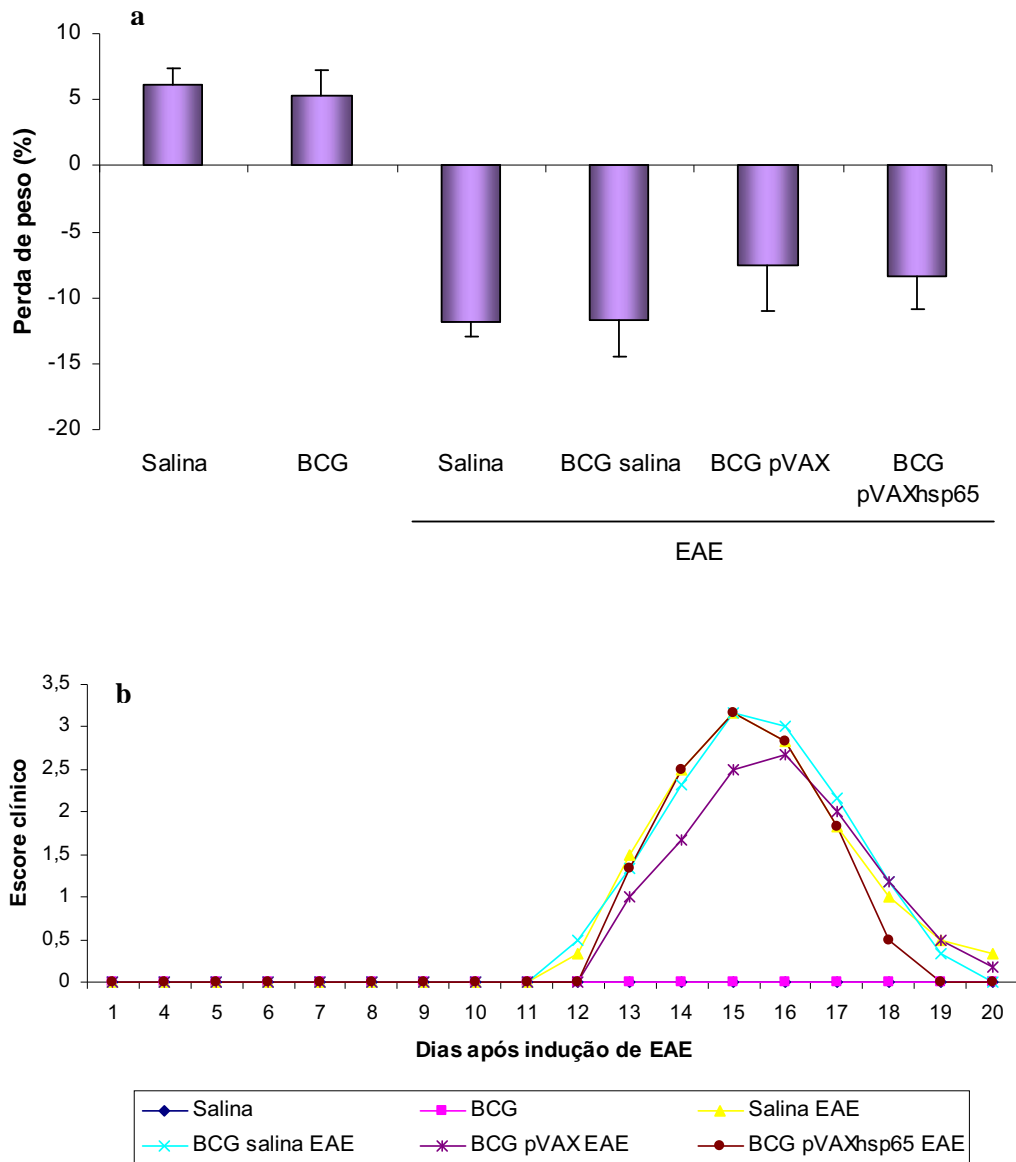


Figura 23: Efeito da estratégia BCG / pVAXhsp65 na evolução do peso corpóreo e escore clínico de ratos Lewis submetidos à indução de EAE. Média da porcentagem de perda de peso dos animais \pm EPM (a). Média do escore clínico dos animais (b).

Na figura 24 são mostrados os cortes de cérebro. Como pode se observar, os dois grupos controles apresentam padrão histológico condizente, ou seja, ausência de inflamação no grupo controle injetado somente com salina (figura 24a) e presença de processo inflamatório típico, caracterizado pela predominância de células mononucleares no espaço perivascular, no grupo controle positivo com EAE, respectivamente (figura 24b). Este mesmo padrão foi, como esperado, constatado nos controles dos cortes de medula cervical (figuras 25a e 25b), torácica (figuras 26a e 26b) e lombar (figuras 27a e 27b).

O efeito da imunização prévia com BCG ou BCG/DNA foi distinto, dependendo da área do SNC que foi analisada. No cérebro, as três estratégias (BCG, BCG / vetor e BCG / DNA) mostradas nas figuras 24c, 24d e 24e, determinaram redução acentuada do processo inflamatório. Nos casos das medulas cervical (figuras 25c, 25d e 25e) e torácica (figuras 26c, 26d e 26e) o processo inflamatório foi acentuado e foi, aparentemente similar ao observado no grupo controle correspondente (salina / EAE). Na região lombar da medula ocorreu menor inflamação nos grupo BCG / EAE (figura 27c) e BCG / pVAXhsp65 / EAE (figura 27e). No grupo BCG / pVAX / EAE, esta redução da inflamação não foi observada (figura 27d).

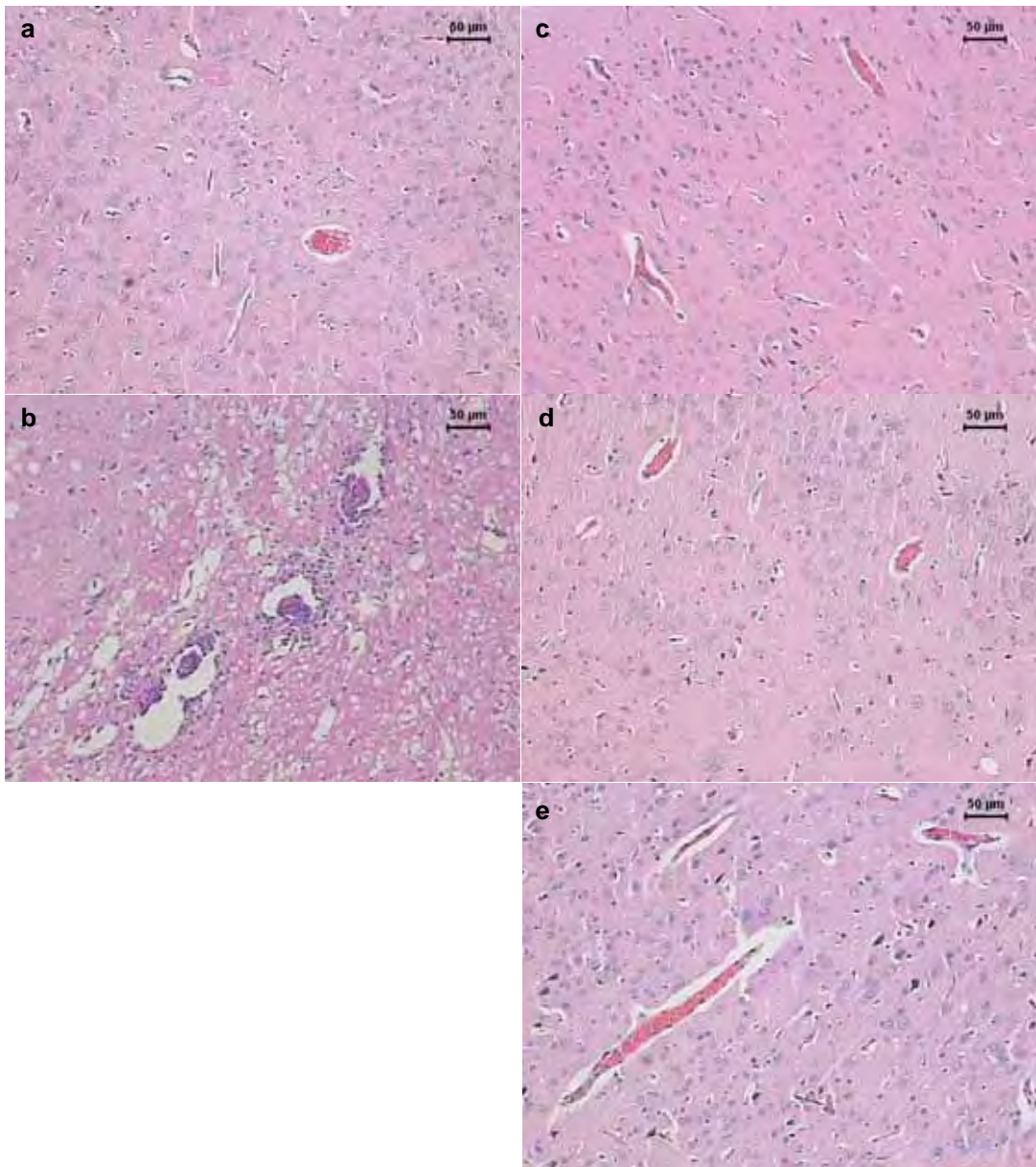


Figura 24: Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 no processo inflamatório no cérebro de animais com EAE. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório no cérebro de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo BCG / EAE (c), do grupo BCG / pVAX / EAE (d) e do grupo BCG / pVAXhsp65 / EAE (e). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

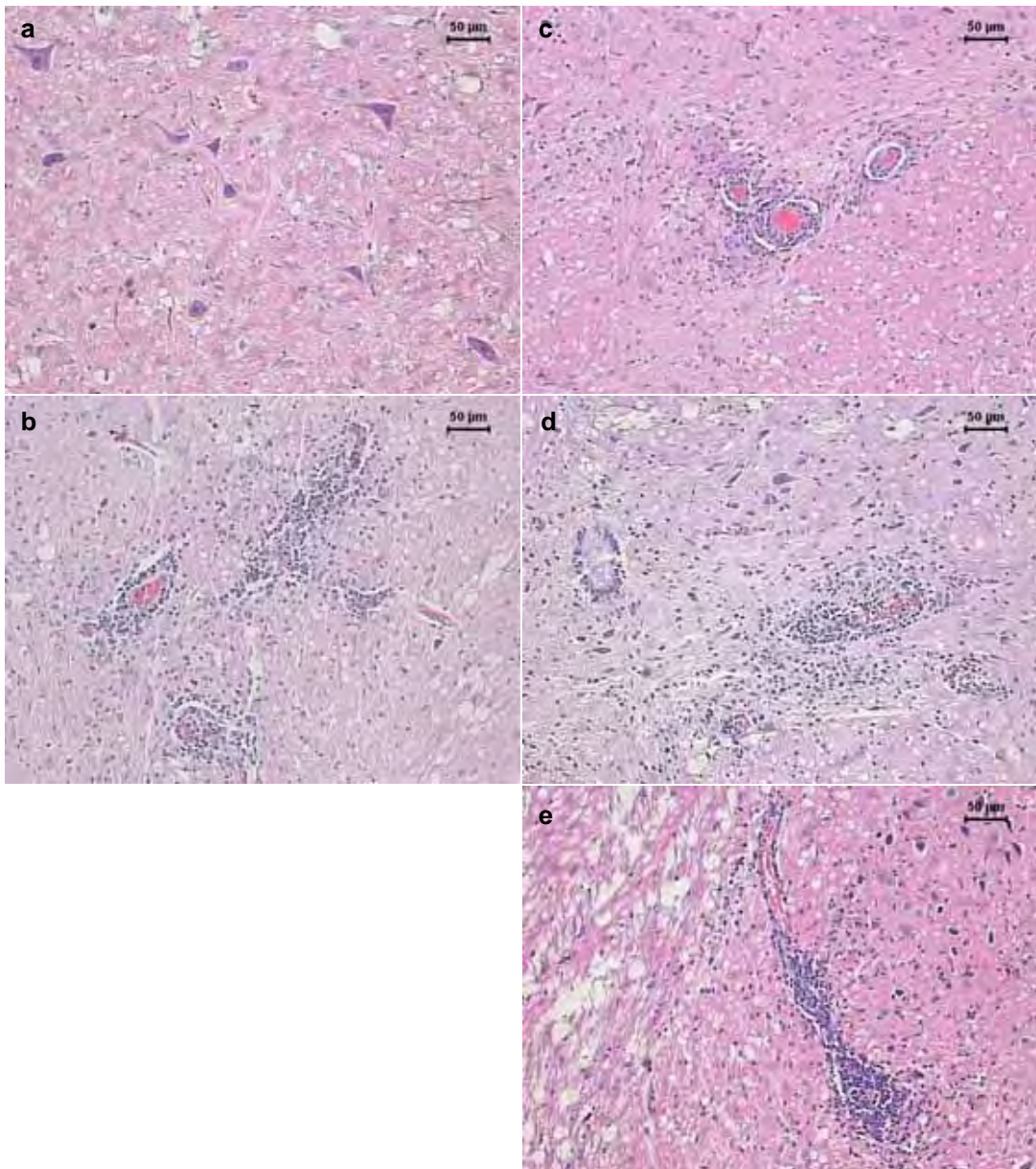


Figura 25: Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 no processo inflamatório na porção cervical da medula espinhal de animais com EAE. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório na medula cervical de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo BCG / EAE (c), do grupo BCG / pVAX / EAE (d) e do grupo BCG / pVAXhsp65 / EAE (e). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

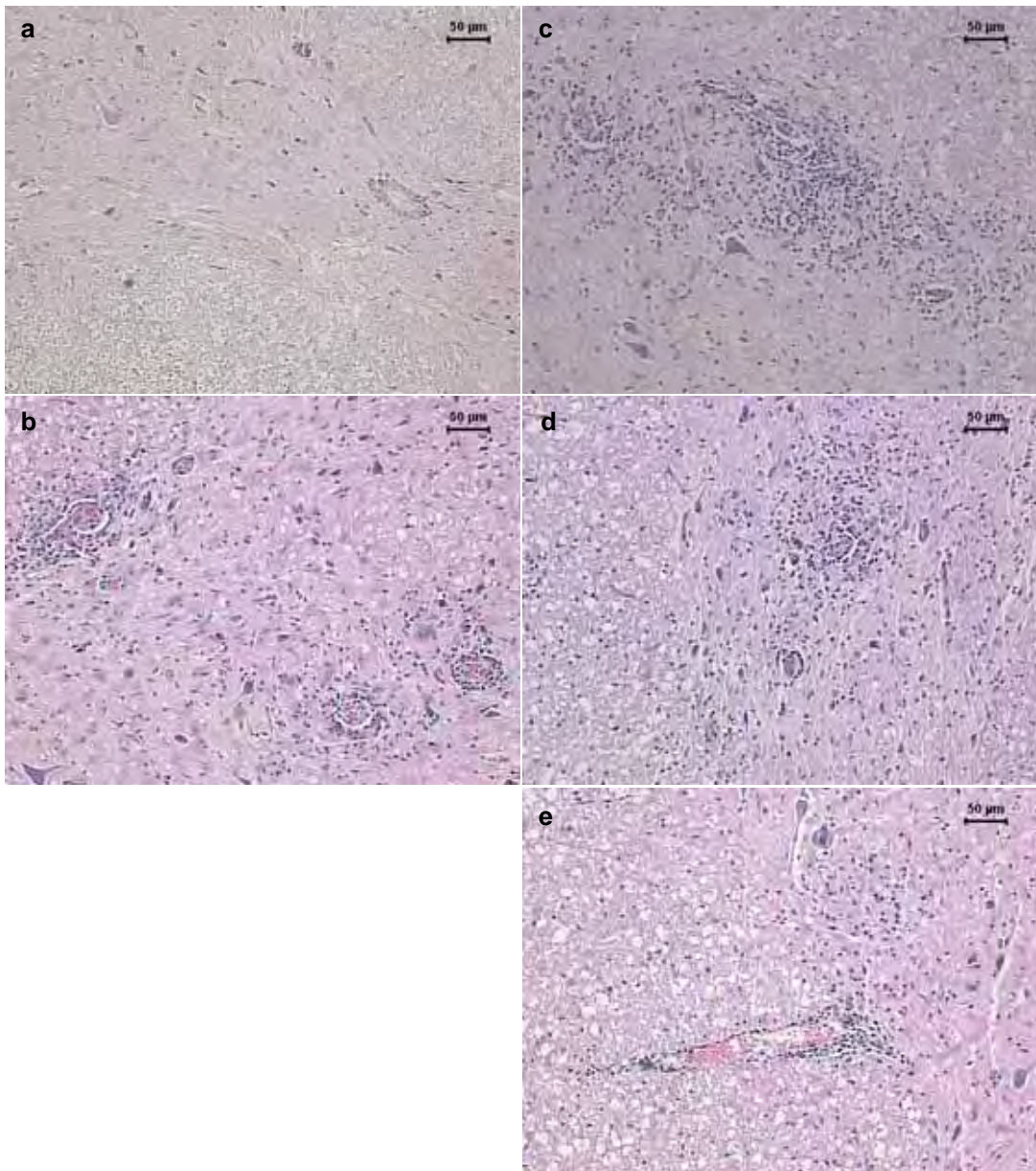


Figura 26: Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 no processo inflamatório na porção torácica da medula espinhal de animais com EAE. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório na medula torácica de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo BCG / EAE (c), do grupo BCG / pVAX / EAE (d) e do grupo BCG / pVAXhsp65 / EAE (e). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

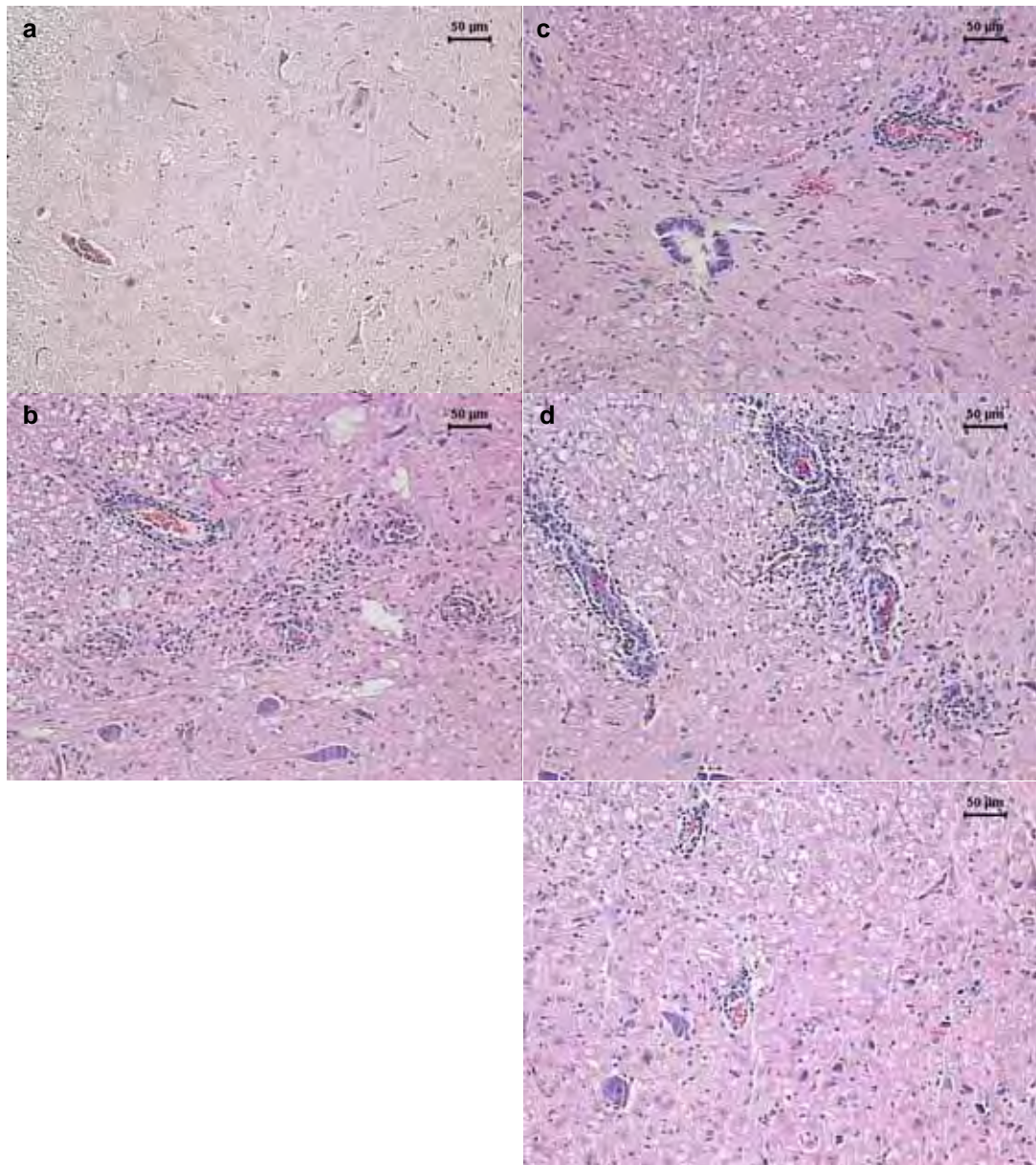


Figura 27: Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 no processo inflamatório na porção lombar da medula espinhal de animais com EAE. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório na medula lombar de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo BCG / EAE (c), do grupo BCG / pVAX / EAE (d) e do grupo BCG / pVAXhsp65 / EAE (e). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

Discussão

5 – Discussão

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada, na maioria dos casos humanos, pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A gravidade da TB é evidenciada pelas informações epidemiológicas e tem sido estimado que 2 bilhões de pessoas, ou seja, cerca de 1/3 da espécie humana está infectada com o Mtb e, portanto, em risco de desenvolver a doença ativa. As estimativas mais recentes indicam 8,8 milhões de novos casos anuais de TB ativa e também prevêem que, destes, 1,6 milhões de casos evoluirão para óbito (World Health Organization, 2007). A imunoprevenção da TB é realizada pela administração da vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin), mas sua eficácia protetora é muito variável (Fine, 1995). Por isto, novas vacinas para TB estão sendo investigadas quanto ao seu potencial de proteção contra esta infecção. Entre as diferentes preparações vacinais se destacam as vacinas gênicas e entre elas a DNAhsp65. Esta vacina foi constituída pela inserção do gene que codifica a hsp65 micobacteriana em um vetor plasmideal. Em vários relatos foi constatado o potencial protetor desta vacina. Entretanto, existem várias preocupações quanto à segurança das vacinas gênicas. Neste caso, em particular, existe a possibilidade, em função da elevada homologia entre a hsp65 micobacteriana e a hsp60 dos vertebrados, que o uso desta vacina possa desencadear ou exacerbar quadros de autoimunidade. Por outro lado, baseado em resultados anteriores que verificaram um efeito protetor da imunização com a vacina gênica DNAhsp65 em outros dois modelos de doenças autoimunes, a artrite e o diabetes experimental, a inoculação de DNAhsp65 ou da associação BCG / DNAhsp65 poderia resultar num efeito protetor da encefalite autoimune experimental. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito desta vacina no desenvolvimento da encefalite autoimune experimental, que é um modelo de esclerose múltipla. Duas estratégias vacinais distintas foram testadas: 1) o protocolo clássico de vacinação gênica, ou seja, 3 doses de DNAhsp65 nu e 2) estratégia *prime-boost* heterólogo definida pelo *priming* com BCG, seguida de *boosters* com DNAhsp65.

Inicialmente, testamos a capacidade desta vacina de induzir resposta imune em ratos Lewis. No primeiro protocolo foram testadas três doses de pVAXhsp65 contendo 100 µg/dose associada com sacarose 25%. Essa escolha

foi baseada em relato anterior de Lowrie et al., (1997), que demonstrou indução de resposta imune específica associada com proteção contra tuberculose experimental murina através deste protocolo. Mais recentemente, concentração similar desta vacina também foi capaz de reduzir significativamente a infecção com *M. tuberculosis* em cobaias, que são animais com peso similar ou até maior do que os de ratos (de Paula et al., 2007). No entanto, esse esquema de vacinação (3 doses de pVAXhsp65, 100 µg/dose) por via intramuscular, induziu apenas uma ativação discreta da imunidade celular demonstrada pelo aumento não significativo da produção de IFN- γ por células esplênicas reestimuladas *in vitro* com rhsp65. Esta baixa dose de DNA não foi capaz de induzir resposta imune humoral específica para rhsp65. Uma maior concentração da vacina (300 µg/dose) foi então testada em função de relatos da literatura que enfatizam a necessidade do uso de maiores concentrações de DNA em animais maiores. Publicações recentes têm descrito a utilização de 150 a 300 µg de DNA para imunizar estes animais (Xiao et al., 2007; Yu et al., 2007). Caracterizamos, então, a resposta imune induzida por três doses de 300 µg de DNA pela via intramuscular. Nestas condições de imunização, verificamos uma produção significativamente maior de IFN- γ especificamente induzida por rhsp65 em animais imunizados com pVAXhsp65. Em relação à resposta imune humoral, constatamos produção significativa de anticorpos IgG2b específicos para mielina, mas não de IgG1. Isto é interessante porque o isotipo IgG2b tem capacidade opsonizante, estando associado à polarização Th1 no rato (Gracie & Bradley, 2006). Na presente investigação, ratos normais ou ratos inoculados com pVAX (vetor plasmidial sem o inserto) não produziram anticorpos anti-hsp56 e IFN- γ após estimulação *in vitro* com rhsp65. Esses resultados sugerem, portanto, que a vacina pVAXhsp65, quando administrada por via intramuscular em ratos Lewis, induz uma resposta imune predominantemente celular, o que é similar aos dados relatados em camundongos imunizados com vacinas gênicas por esta via (Gurunathan et al., 2000).

A predominância de um padrão de resposta no sentido Th1 após imunização com pVAXhsp65 poderia, teoricamente, contribuir para acelerar ou agravar a EAE. Essa suposição é baseada no fato de que ambas, EM e EAE são mediadas principalmente por células Th1 produtoras de IFN- γ (Mustafa et al.,

1991; Imitola et al., 2005). Alguns relatos têm demonstrado também a presença de resposta imune anti-hsp65 durante o desenvolvimento da EM e da EAE (Birnbaum, 1995; Birnbaum & Kotilinek, 1997). Além disso, DNA bacteriano e oligodeoxynucleotídeos, que contêm sequências CpG, têm sido relatados como imunomoduladores, exacerbando os quadros de autoimunidade em modelos experimentais de EM (Tsunoda et al., 1999; Segal et al., 2000). Uma investigação mais detalhada tem sido feita em outras patologias autoimunes como diabetes e artrite. Pesquisadores descreveram a presença de anticorpo anti-hsp65 no soro de pacientes com diabetes mellitus dependente de insulina (Takei et al., 1993). Já no caso da artrite, foi demonstrada a presença de células T específicas para hsp65 nas articulações de pacientes com artrite (Res et al., 1991).

Observamos, inicialmente, que a evolução clínica da EAE foi similar entre os animais vacinados e os não vacinados, ou seja, não constatamos diferenças na perda de peso ou no escore clínico da EAE nestes dois grupos. Os resultados do escore clínico poderiam até sugerir um pequeno efeito protetor. Pensando na possibilidade de que este efeito pudesse ser mais acentuado na fase aguda, fizemos um protocolo de análise de escore clínico nesta fase. Entretanto, também não observamos efeito evidente. O não agravamento das manifestações clínicas é um achado importante, pois sugere que esta vacina não possui efeitos colaterais no caso desta patologia. Associado aos estudos feitos anteriormente pelo nosso grupo nos modelos de artrite e diabetes autoimune (Santos-Junior et al., 2005; Santos Júnior et al., 2007), este resultado indica que esta vacina, apesar de sua elevada homologia com a correspondente em mamíferos (Jindal et al., 1989), não foi capaz de acelerar ou exacerbar doenças autoimunes. Apesar de existirem várias outras doenças autorreativas, estas três são aquelas na qual a autorreatividade para hsp60/65 tem sido mais investigada. Neste contexto, entendemos que esta vacina pode ser agora explorada no sentido de ter sua eficácia protetora otimizada.

A possibilidade de que estivesse ocorrendo um efeito protetor, sugerido de forma muito sutil pela análise do escore clínico, foi esclarecido e confirmado pela análise histopatológica subsequente. Cérebro de animais previamente inoculados com pVAX ou pVAXhsp65 não apresentaram focos inflamatórios perivascularares, ou seja, o aspecto histológico foi semelhante ao de animais normais (sem o desenvolvimento de EAE). Nos cortes de medula cervical e torácica dos animais

controle com EAE observamos presença de células mononucleares dispersas pelo tecido. Este fato não foi observado nos animais previamente inoculados com vetor ou vacina, nos quais o infiltrado inflamatório foi menos intenso e restrito à região perivascular. Nos cortes de medula lombar, a imunização prévia com DNAhsp65 reduziu a intensidade do infiltrado inflamatório perivascular comparado ao grupo controle e pVAX. Esse mecanismo de proteção diferencial no cérebro e na medula espinhal não foi investigado. Gostaríamos de ressaltar, entretanto, que a interação de leucócitos circulantes com o endotélio de ambas as barreiras, hemato-encefálica e hemato-medula espinhal, têm um papel fundamental no processo inflamatório do SNC. Nesse contexto, diferenças nas moléculas de adesão, quimiocinas e outros receptores presentes nessas barreiras poderiam explicar esses achados (Engelhardt, 2006). Este efeito protetor foi discreto, mas acreditamos que o mesmo seja relevante, pois existe amplo suporte para o mesmo na literatura (Hauet-Broere et al., 2006). Várias evidências indicam que este efeito antiinflamatório da hsp60/65 é dominante, comparativamente a um possível efeito deletério autoimune. Estudos visando esclarecer este mecanismo antiinflamatório em várias doenças autoimunes indicam que a hsp60/65 tem a habilidade de induzir células T reguladoras capazes de suprimir o processo inflamatório (van Eden et al., 2005). Publicação recente sugere, inclusive, o uso de vacina de DNA constituída pelo gene da hsp65 como uma estratégia para a indução de células Treg específicas para esta proteína capazes de controlar doenças autoimunes (Quintana & Cohen, 2005).

Interessantemente, esse efeito antiinflamatório está associado com um efeito imunomodulador tanto da resposta imune humoral quanto celular. Essa modulação foi caracterizada por uma redução da produção de IgG1 anti-mielina e da produção de IFN- γ e IL-10 em culturas de células de órgãos linfóides secundários. Esse efeito modulador observado pela produção de citocina pode explicar a redução do processo inflamatório. Embora o IFN- γ exerça um papel importante da imunopatogênese da EM e da EAE (Willenborg et al., 1996; Imitola et al., 2005; Xiao et al., 2008), estudos recentes sugerem que essa citocina desempenha um papel regulador (Wheeler & Owens, 2005). Essa possibilidade é reforçada por trabalhos empregando modelos experimentais para EM e artrite. Utilizando camundongos *Knockout* para o receptor de IFN- γ como modelo de

EAE, pesquisadores demonstraram que essa citocina é crucial no controle da doença (Willenborg et al., 1999). Esses achados foram posteriormente confirmados e o mecanismo de proteção foi parcialmente elucidado. O IFN- γ modula a inflamação no SNC através da regulação da expressão de quimiocinas e também aumenta a apoptose das células T infiltrantes no SNC (Tran et al., 2000; Furlan et al., 2001). Essa capacidade regulatória do IFN- γ , em conjunto com o TNF- α , foi recentemente revisada por pesquisadores com ênfase na artrite adjuvante, que verificaram que determinadas concentrações de IFN- γ e TNF- α são necessárias para desencadear uma doença autoimune. No entanto, abaixo de certo nível, essas citocinas desencadeiam mecanismos reguladores que suprimem o desenvolvimento da doença (Kim & Moudgil, 2008). Nesse contexto, nós acreditamos que a redução da produção de IFN- γ e IL-10 observados nos órgãos linfóides secundários encontrados no nosso trabalho, pode ser devido a migração das células T produtoras dessas citocinas para o SNC, onde controlariam o tráfico e a apoptose das células T encefalíticas.

Comparativamente aos efeitos protetores observados por nosso grupo em outros modelos de autoimunidade como artrite (Santos-Junior et al., 2005) e diabetes (Santos Júnior et al., 2007); o efeito protetor desencadeado pela DNAhsp65 neste modelo de EAE foi discreto. É possível que isto se deva à peculiaridade do modelo EAE em ratos Lewis. Neste caso a doença se caracteriza por uma evolução aguda acompanhada de recuperação e resistência a uma indução posterior da doença (Racke, 2001). Além disto, está caracterizada a indução de células Treg durante a evolução da doença (O'Connor & Anderton, 2008). É possível que este efeito fosse muito mais marcante se utilizássemos camundongos como modelo de EM.

Através deste protocolo inicial, observamos o efeito protetor desta vacina na inflamação do SNC, mas não no escore clínico. A literatura é escassa a este respeito, mas é descrito que a paralisia na EAE em ratos Lewis é devida ao edema e não ao processo inflamatório (Swanborg 2001).

Na segunda etapa deste projeto, avaliamos o efeito do esquema *prime-boost* BCG/DNAhsp65 no desenvolvimento da EAE. A inclusão deste tipo de avaliação foi considerada importante não só porque a manutenção do BCG no contexto de uma nova estratégia vacinal é altamente desejável, mas também

porque este protocolo mostrou efeito protetor mais acentuado do que a utilização só de DNAhsp65 (Orme, 2005; Gonçalves et al., 2007). Dentro deste contexto, avaliamos inicialmente, se as preparações vacinais empregadas neste protocolo estavam induzindo resposta imune ou desencadeando alterações condizentes com ativação imunológica. No caso da inoculação de BCG ocorreu produção tanto de IFN- γ quanto de IL-10. Como a IL-10 é considerada indicadora de padrão Th2 no rato, a produção concomitante destas duas citocinas poderia indicar a existência de um padrão misto Th1/Th2 nos animais injetados com BCG. Neste protocolo não testamos a vacina DNAhsp65 sozinha, mas sim associada ao BCG. Neste caso, detectamos IgG1 anti-hsp65 tanto nos animais vacinados com BCG quanto com BCG / DNAhsp65. A produção de anticorpos anti-hsp65 em animais vacinados com BCG é esperada uma vez que esta micobactéria também contém um gene que codifica esta proteína (Dai et al., 2004). A análise de um lisado de BCG revelou elevada concentração de hsp, mostrando que este gene está ativado e que esta proteína é liberada pela bactéria (De Bruyn et al., 2000). Somente nos animais vacinados com BCG/DNAhsp65 foi detectado o isotipo IgG2b anti-hsp65. Este resultado é coerente com os observados no primeiro protocolo, no qual constatamos produção significativa de anticorpos IgG2b específicos para rhsp65, mas não de IgG1. Em princípio, estes resultados sugerem que esta associação de *prime-boost* heterólogo (BCG/DNAhsp65) poderia modificar o padrão Th1 originalmente induzido pela vacina em um padrão misto. Realmente, em trabalho recentemente publicado, constatamos que esta associação utilizando BCG como *priming* e DNA como *booster* determinou um padrão de resposta Th1 / Th2 (Pelizon et al., 2007). É possível que este efeito modulador do BCG seja dependente da dose utilizada semelhante ao que parece ocorrer com seu efeito protetor. Segundo Tree et al., (2004) a inoculação de BCG intranasal protegeu os animais contra a infecção com *M. tuberculosis* de uma forma dose-dependente. Essa proteção foi evidenciada pela redução da formação de granulomas no pulmão. Outro trabalho mais recente demonstrou uma proteção eficaz contra a infecção por *M. tuberculosis* em cobaias após a utilização de uma baixa dose de BCG recombinante (Horwitz et al., 2006). A grande variabilidade dos resultados referentes aos níveis de IFN- γ e IL-10 dificulta a interpretação dos mesmos. A comparação dos diferentes grupos submetidos à indução de EAE

sugere um nível discretamente aumentado destas duas citocinas no grupo BCG / DNAhsp65, em comparação com os demais.

Tendo constatado que as duas preparações vacinais eram dotadas de imunogenicidade neste modelo, avaliamos a seguir, o efeito destes protocolos na resposta imune induzida pela imunização com a mielina. O efeito modulador sobre a resposta imune humoral foi evidente: a DNAhsp65, mas não o BCG, determinou aumento significativo nos níveis de IgG1 anti-mielina. Este resultado foi considerado interessante porque poderia indicar uma modulação positiva preferencial para o sentido Th2 já que a IgG1 está associada com as citocinas produzidas por esta subpopulação (Romagnani, 2006). A variabilidade dos níveis de citocinas mais uma vez dificultaram o entendimento dos resultados; entretanto observamos um padrão similar na produção de IFN- γ e IL-10 caracterizado por uma diminuição destes níveis nos grupos BCG, BCG/vetor e BCG/ vacina, em comparação com o grupo controle salina, ou seja, não imunizado previamente. Em função dos mecanismos imunopatogénicos envolvidos na EM e na EAE, poderíamos hipotetizar que no caso dos animais previamente vacinados com BCG ou DNAhsp65, esta menor produção de IFN- γ e IL-10 nos órgãos linfóides periféricos se deve a uma migração destas células para o SNC onde está ocorrendo o ataque autoimune. Esta possibilidade é corroborada por achados recentes publicados por Sonobe et al., (2007). Neste trabalho os autores verificaram a presença de células TCD4+ e TCD8+ reativas para MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) no SNC de camundongos com encefalite em maior quantidade durante o pico de gravidade da doença, indicando que estas células possuem um papel importante no desenvolvimento da EAE. Já no baço desses animais foi detectada uma menor quantidade dessas células específicas para MOG e não houve um aumento durante o pico da doença.

Tendo demonstrado que as imunizações prévias modulavam a resposta imune anti-mielina, avaliamos a seguir, o efeito sobre o desenvolvimento da EAE. Para isto, avaliamos os três parâmetros que são considerados mais relevantes para caracterizar o desenvolvimento da EAE: perda de peso, escore clínico e intensidade do processo inflamatório no SNC. De forma similar ao que ocorreu no protocolo anterior, a evolução clínica da EAE foi similar entre os animais vacinados e os não vacinados, pois não foram detectadas diferenças importantes entre os grupos. A análise histopatológica preliminar confirmou a ausência de

efeito colateral deletério da estratégia *prime-boost*, pois não foi detectado um aumento do processo inflamatório no SNC destes animais. No contexto de uma nova vacina para TB este resultado é, como o observado no protocolo III, relevante, pois sugere que a vacina DNAhsp65, mesmo quando administrada sob a forma de um esquema de *prime-boost*, não acelera ou agrava um quadro de autoimunidade no SNC.

Como também já tínhamos observado no protocolo anterior, tanto para o vetor quanto para a vacina, a inflamação perivascular no cérebro foi significativamente diminuída pela imunização prévia com BCG, BCG / vetor e BCG / vacina. O tipo de análise utilizada, que consistiu em uma inspeção visual, não permitiu uma comparação quantitativa entre os diferentes grupos.

Neste contexto, os resultados obtidos com estes protocolos experimentais são considerados bastante promissores em relação a esta vacina gênica para a tuberculose, visto que sugerem que a vacinação com essa construção gênica, isoladamente ou associada ao BCG, não acelerou ou agravou o desenvolvimento da EAE. Além disto, estes resultados apontam para um possível efeito protetor desta vacina na EAE, similar ao que descrevemos anteriormente para diabetes e artrite. Utilizando camundongos selecionados para uma reação inflamatória máxima (AIRmax), foi observado que a imunização com pVAXhsp65 ou seu vetor pVAX não acarretou artrite enquanto que inoculação de pristane resultou em 62% de incidência da doença. Além disso, administração de pVAXhsp65 após a inoculação de pristane reduziu significativamente a incidência de artrite nos animais AIRmax. Esse efeito protetor estava associado a uma redução da produção de IL-6 e IL-12 e concomitante aumento de IL-10 (Santos-Júnior et al., 2005). Esta vacina também preveniu a progressão do diabetes em camundongos NOD, que desenvolvem, espontaneamente, insulite pancreática progressiva associada com elevados níveis de glicose. Este efeito, mais evidenciado com a imunização com pVAXhsp65 comparado a inoculação apenas do vetor (pVAX), foi associado a uma alteração do padrão do infiltrado celular no pâncreas. Essa mudança de padrão incluiu redução do infiltrado de células T CD4+ e CD8+, influxo de células CD25+ e aumento da marcação para IL-10 nas ilhotas (Santos-Júnior et al., 2007).

Além da relevância dos resultados observados em termos de continuidade dos estudos sobre o efeito protetor desta vacina, estes resultados estimulam uma

discussão importante sobre os novos rumos que poderiam ser seguidos por nossa equipe de pesquisa. Em função de publicações recentes sobre a participação de células Treg na resposta imune (Allan et al., 2008; Brusko et al., 2008) e de dados mais clássicos da literatura, que mostram de forma evidente o potencial antiinflamatório da hsp65 (van Eden et al., 2005), é bastante provável que a vacina DNAhsp65 induza células Tregs. Neste contexto uma próxima etapa seria avaliar estratégias vacinais, profiláticas ou terapêuticas, baseadas no efeito imunorregulador da hsp65 na EAE induzida por MOG em camundongos C57BL/6, que reproduz a cronicidade da esclerose múltipla humana.

Referências Bibliográficas

6 – Referências Bibliográficas *

1. Allan SE, Broady R, Gregori S, Himmel ME, Locke N, Roncarolo MG, et al. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev.* 2008;223:391-421.
2. Anderton SM, van Der Zee B, Prakken A, Noordzij A, van Eden W. Activation of T cells recognizing self 60-kDa heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J Exp Med.* 1995;181:943-52.
3. Baik SH, Park IB, Choi KM, Kim YH, Kim NH, Kim SJ, et al. BCG vaccine prevents insulinitis in low dose streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999;46:91-7.
4. Bersani-Amado CA, Barbuto JA, Jancar S. Comparative study of adjuvant induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. II. Effect of oral administration of BCG and PPD. *J Reumatol.* 1990;17:738-42.
5. Birnbaum G. Stress proteins: their role in the normal central nervous system and in disease states, especially multiple sclerosis. *Springer Semin Immunopathol.* 1995;17:107-18.
6. Birnbaum G, Kotilinek L, Schlievert P, Clark HB, Trotter J, Horvath E, et al. Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): I. Immunization with a peptide of the myelin protein 2',3' cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase that is cross-reactive with a heat shock protein alters the course of EAE. *J Neurosci Res.* 1996;44:381-96.
7. Birnbaum G, Kotilinek L. Heat shock or stress proteins and their role as autoantigens in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;835:157-67.
8. Birnbaum G, Kotilinek L. Immunity to heat shock proteins and neurological disorders of women. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999;7:39-48.
9. Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun.* 1998;66:169-75.

* International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscript Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: http://www.nlm.gov/bsd/uniform_requirements.html. National Library of Medicine. List of Journal indexed in Index Medicus. Washington; 2003. 240p.

10. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev.* 2008;223:371-90.
11. Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, et al. The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics.* 1995;96:29-35.
12. Dai W, Liang L, Gao H, Huang H, Chen Z, Cheng J, et al. Construction, expression and identification of a recombinant BCG vaccine encoding human *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 65. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2004;24:107-11.
13. Dannenberg Jr AM. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp Pract.* 1993;28:51-8.
14. De Bruyn J, Soetaert K, Buysens P, Calonne I, De Coene JL, Gallet X, et al. Evidence for specific and non-covalent binding of lipids to natural and recombinant *Mycobacterium bovis* BCG hsp60 proteins, and to the *Escherichia coli* homologue GroEL. *Microbiology.* 2000;146:1513-24.
15. de Paula L, Silva CL, Carlos D, Matias-Peres C, Sorgi CA, Soares EG, et al. Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Genet Vaccines Ther.* 2007;24:5:2.
16. Doria-Rose NA, Haigwood NL. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods.* 2003;31:207-16.
17. Elloso MM, Phiel K, Henderson RA, Harris HA, Adelman SJ. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligand. *J Endocrinol.* 2005;185:243-52.
18. Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm.* 2006;113:477-85.
19. Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol.* 1997;158:2278-84.
20. Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, Coade S, Espitia C, Lowrie DB, et al. A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial hsp70, hsp65, and Apa antigens

- improves protection against tuberculosis in mice. *Infect Immun.* 2004;72:6945-50.
21. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* 1995;346:1339-45.
 22. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev.* 2007;6:169-75.
 23. Furlan R, Brambilla E, Ruffini F, Poliani PL, Bergami A, Marconi PC, et al. Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes. *J Immunol.* 2001;167:1821-9.
 24. Gao YL, Brosnam CF, Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis. Quantitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system. *J Immunol.* 1995;154: 3548-56.
 25. Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol.* 1996;26:1217-21.
 26. Gonçalves ED, Bonato VL, da Fonseca DM, Soares EG, Brandão IT, Soares AP, et al. Improve protective efficacy of a TB DNA-HSP65 vaccine by BCG priming. *Genet Vaccines Ther.* 2007;22:5:7.
 27. Gurunathan S, Slinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application and optimization. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:927-74.
 28. Harada M, Kishimoto Y, Makino S. Prevention of overt diabetes and insulinitis in NOD mice by a single BCG vaccination. *Diabetes Res Clin Pract.* 1990;8:85-9.
 29. Hartl A, Weiss R, Hochreiter R, Scheiblhofer S, Thalhamer J. DNA vaccines for allergy treatment. *Methods.* 2004;32:328-39.
 30. Hauet-Broere F, Wieten L, Guichelaar T, Berlo S, van der Zee R, Van Eden W. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:65-8.
 31. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 2004;199:9-26.

32. Heneka MT, Sharp A, Murphy P, Lyons JA, Dumitrescu L, Feinstein DL. The heat shock response reduces myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Neurochem.* 2001;77:568-79.
33. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galić S. Extraordinarily few organisms of a live recombinant BCG vaccine against tuberculosis induce maximal cell-mediated and protective immunity. *Vaccine.* 2006;24:443-51.
34. Huygen K. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect.* 2005;7:932-8.
35. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther.* 2005;106:163-77.
36. 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.
37. Itil IM, Cirpan T, Akercan F, Gamaa A, Kazandi M, Kazandi AC, et al. Effect of BCG on peritoneal endometriotic implants in a rat model of endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006;46:38-41.
38. Jardim JR, Nascimento O. Respiratory health in Brazil. *Chron Respir Dis.* 2007;4:45-9.
39. Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, Gupta RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol.* 1989;9:2279-83.
40. Jones DB, Coulson AF, Duff GW. Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. *Immunol Today.* 1993;14:115-8.
41. Karonga Prevention Trial Group. Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. *Lancet.* 1996;348:17-24.
42. Kaslow DC. A potential disruptive technology in vaccine development: gene-based vaccines and their application to infectious diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98:593-601.
43. Kaufmann SH, Våth U, Thole JE, Van Embden JD, Emmrich F. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms

- and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *Eur J Immunol.* 1987;17:351-7.
44. Kaufmann SH. Heat shock proteins and immune response. *Immunol Today.* 1990;11:129-36.
45. Kaufmann SH, Schoel B, van Embden JD, Koga T, Wand-Württenberger A, Munk ME, et al. Heat-shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections. *Immunol Rev.* 1991;121:67-90.
46. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 2001;1:20-30.
47. Kim EY, Moudgil KD. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. *Immunol Lett.* 2008;120:1-5.
48. 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.
49. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21:467-76
50. Lamb JR, Bal V, Mendez-Samperio P, Mehlert A, So A, Rothbard J, et al. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol.* 1989;1:191-6.
51. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201:233-40.
52. Link H, Xiao B. Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol Rev.* 2001;184:117-28.
53. Liu JQ, Bai XF, Shi FD, Xiao BG, Li HL, Levi M, et al. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by nasal administration of encephalitogenic MBP peptides: synergistic effects of MBP. *Int Immunol.* 1998;10:1139-48.
54. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002;8:500-8.
55. Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine.* 1997;15:834-8.

56. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*. 1999;400:269-71.
57. 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.
58. Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999;5:101-4.
59. Meya DB, McAdam KP. The TB pandemic: an old problem seeking new solutions. *J Intern Med*. 2007;261:309-29.
60. Mollenkopf HJ, Grode L, Mattow J, Stein M, Mann P, Knapp B, et al. Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. *Infect Immunol*. 2004;72:6471-9.
61. Mor F, Cohen IR. T cells in the lesion of experimental autoimmune encephalomyelitis. Enrichment for reactivities to myelin basic protein and to heat shock proteins. *J Clin Invest*. 1992;90:2447-55.
62. Mustafa MI, Diener P, Höjeberg B, Van der Meide P, Olsson T. T cell immunity and interferon-gamma secretion during experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol*. 1991;31:165-77.
63. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Suzuki M, Koide Y. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. *DNA Cell Biol*. 2004;23:93-106.
64. Namer IJ, Steibel J, Klinguer C, Trifilieff E, Mohr M, Poulet P. Magnetic resonance imaging of PLP-induced experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol*. 1998;92:22-8.
65. O'Connor RA, Anderton SM. Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol*. 2008;193:1-11.
66. Orme IM. Tuberculosis vaccines: current progress. *Drugs*. 2005;65:2437-44.
67. Pavlenko M, Leder C, Pisa P. Plasmid DNA vaccines against cancer: cytotoxic T-lymphocyte induction against tumor antigens. *Expert Rev Vaccines*. 2005;4:315-27.

68. Pelizon AC, Martins DR, Zorzella SFG, Trombone AP, Lorenzi JC, Carvalho RF, et al. Genetic vaccine for tuberculosis (pVAXhsp65) primes neonate mice for a strong immune response at the adult stage. *Genet Vaccines Ther.* 2007;29:5:12.
69. Pereira SM, Dantas OM, Ximenes R, Barreto ML. BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. *Rev Saúde Publica.* 2007;41:59-66.
70. Prakken AB, van Eden W, Rijkers GT, Kuis W, Toebes EA, de Graeff-Meeder ER, et al. Autoreactivity to human heat-shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1826-32.
71. Prud'homme GJ, Draghia-Akli R, Wang Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. *Gene Ther.* 2007;14:553-64.
72. Qin HY, Chaturvedi P, Singh B. In vivo apoptosis of diabetogenic T cells in NOD mice by IFN-gamma/TNF-alpha. *Int Immunol.* 2004;16:1723-32.
73. Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR. Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60. *J Immunol.* 2002;169:3422-8.
74. Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR. DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. *J Immunol.* 2003;171:3533-41.
75. Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by DNA vaccination with the 70-kd or the 90-kd human heat-shock protein: immune cross-regulation with the 60-kd heat-shock protein. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3712-20.
76. Quintana FJ, Cohen IR. DNA vaccines coding for heat-shock proteins (HSPs): tools for the activation of HSP-specific regulatory T cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5:545-54.
77. Racke MK. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Curr Protoc Neurosci.* 2001;9:Unit9.7.
78. Ragno S, Colston MJ, Lowrie DB, Winrow VR, Blake DR, Tascon R. Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65. *Arthritis Rheum.* 1997;40:277-83.


79. Raine CS. The Dale e. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol.* 1994;36:61-72.
80. Res P, Thole J, de Vries R. Heat-shock proteins and autoimmunity in humans. *Springer Semin Immunopathol.* 1991;13:81-98.
81. Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 1993;22:1154-8.
82. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy.* 2006;36:1357-66.
83. Santos-Junior RR, Sartori A, De Franco M, Filho OG, Coelho-Castelo AA, Bonato VL, et al. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. *Hum Gene Ther.* 2005;16: 1338-45.
84. Santos Júnior RR, Sartori A, Bonato VL, Coelho Castelo AA, Vilella CA, Zollner RL, et al. Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression. *Clin Exp Immunol.* 2007;149:570-8.
85. Segal BM, Chang JT, Shevach EM. CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J Immunol.* 2000;164:5683-8.
86. Sewell DL, Reinke EK, Co DO, Hogan LH, Fritz RB, Sandor M, et al. Infection with *Mycobacterium bovis* BCG diverts traffic of myelin oligodendroglial glycoprotein autoantigen-specific T cells away from central nervous system and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:564-72.
87. Silberberg DH. Doenças desmielinizantes. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC, editors. *Tratado de Medicina interna.* Rio de Janeiro: Medsi;1992. p.2243-9.
88. Silva CL, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Leão SC. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin or DNA vaccination. *Immunology.* 1999;97:573-81.
89. Sonobe Y, Jin S, Wang J, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, et al. Chronological changes of CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in the

- experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. Chronological changes of CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. *Tohoku J Exp Med.* 2007;213:329-39.
- 90.** Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683-747.
- 91.** Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell.* 1996;85:299-302.
- 92.** Sterne JA, Rodrigues LC, Guedes IN. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2:200-7.
- 93.** Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev.* 2001;184:129-35.
- 94.** Takei I, Kasatani T, Watanabe K, Kasuga A, Shimada A, Maruyama T, et al. Detection of heat shock protein in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1993;21:25-9.
- 95.** Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol.* 2000;164:2759-68.
- 96.** Tree JA, Williams A, Clark S, Hall G, Marsh PD, Ivanyi J. Intranasal bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine dosage needs balancing between protection and lung pathology. *Clin Exp Immunol.* 2004;138:405-9.
- 97.** Tsunoda I, Tolley ND, Theil DJ, Whitton JL, Kobayashi H, Fujinami RS. Exacerbation of viral and autoimmune animal models for multiple sclerosis by bacterial DNA. *Brain Pathol.* 1999;9:481-93.
- 98.** Ulmer JB, Fu TM, Deck RR, Friedman A, Guan L, DeWitt C, et al. Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol.* 1998;72:5648-53.
- 99.** van Eden W, Thole JE, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JD, Hensen EJ, et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature.* 1988;331:171-3.
- 100.** van Eden W, Koets A, van Kooten P, Prakken B, van der Zee R. Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity. *Vaccine.* 2003;21:897-901.

101. van Eden W, Hauet-Broere F, Berlo S, Paul L, van der Zee R, de Kleer I, et al. Stress proteins as inducers and targets of regulatory T cells in arthritis. *Int Rev Immunol*. 2005;24:181-97.
102. Wheeler RD, Owens T. The changing face of cytokines in the brain: perspectives from EAE. *Curr Pharm Des*. 2005;11:1031-7.
103. Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1996;157:3223-7.
104. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol*. 1999;163:5278-86.
105. World Health Organization [homepage on the internet]. Neurological disorders a public health approach. Geneva: WHO; 2006 [cited 2008 out 06]. Available from: http://www.who.int/mental_health/neurology/chapter_3_a_neuro_disorders_public_h_challenges.pdf
106. World Health Organization [homepage on the Internet]. Tuberculosis fact sheet. Fact Sheet No.104. Geneva: WHO; 2007 [cited 2007 nov 22]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/print.html>.
107. Xiao BG, Ma CG, Xu LY, Link H, Lu CZ. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol*. 2008;45:1191-6.
108. Xiao J, Li S, Wang W, Li Y, Zhao W. Protective effects of overexpression TCR V β 5.2 HSP70 and TCR V β 8.2-HSP70 against collagen-induced arthritis in rats. *Cell Mol Immunol*. 2007;4:439-45.
109. Yang XD, Gasser J, Feige U. Prevention of adjuvant arthritis in rats by a nonapeptide from the 65-kD mycobacterium heat-shock protein. *Clin Exp Immunol*. 1990;81:189-94.
110. Yu P, Huang L, Zou J, Zhu H, Wang X, Xu XM, et al. DNA vaccine against NgR promotes functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Brain Res*. 2007;1147:66-76.



7 – Anexos

7.1 – Comitê de Ética

unesp  **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99




Comissão de Ética em Experimentação Animal

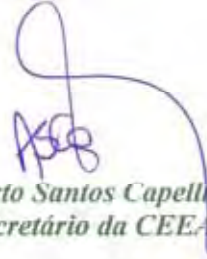
CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 553 sobre o Projeto de Pesquisa “Efeito de estratégias vacinais para tuberculose na encefalite autoimune experimental (EAE)”, a ser conduzido por Sofia Fernanda G. Zorzella, Juliana Seger, Douglas Rodriguês Martins, Thais G. Donegá França e Célio Lopes da Silva, orientados pela Profª Drª Alexandrina Sartori, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foi apresentado pelos pesquisadores Atestado de Saúde dos Animais, fornecido pelo CEMIB/UNICAMP.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 30 de agosto de 2.006


Profª Drª Norma Sueli P. Modolo
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

7.2 – Manuscrito I

Immunization with pVAXhsp65 decreases inflammation and modulates immune response in experimental encephalomyelitis

Abstract

pVAXhsp65 is a new tuberculosis vaccine that contains a mycobacterial heat shock protein (hsp65). As theoretically it could, by molecular mimicry, trigger or worsen an autoimmune pathology, we investigated its effect on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Female Lewis rats were immunized with pVAXhsp65 and injected with myelin basic protein. Immunization with pVAXhsp65 induced a specific immune response but did not change EAE clinical parameters. However, the vaccine decreased brain inflammation and IFN- γ and IL-10 *in vitro* production. Our data demonstrated that this vaccine does not trigger a deleterious effect on EAE development and also points to a potential protective effect.

Keywords: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Rats Inbred Lew

DNA vaccine

Tuberculosis

Heat shock protein

1. Introduction

One third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) and this disease kills nearly 2 million people annually. Current approaches to tuberculosis (TB) control are expensive, have limited efficacy and are being overcome by the appearance of drug-resistance strains (Ernst et al., 2007).

The only currently available vaccine against TB is Calmette-Guérin Bacillus (BCG) whose protective efficacy varies from 0 to 80% (Colditz et al., 1994; Andersen and Doherty, 2005). Consequently, a major effort has been done to

develop a new vaccine against TB. Experimental evidences indicate that DNA vaccines, due to their ability to induce a strong Th1 type of response, could contribute to TB control. Our group has previously shown that a DNA plasmid encoding the *Mycobacterium leprae* 65-kDa heat shock protein displayed both a prophylactic (Bonato et al., 1998) and therapeutic effect in a murine model of tuberculosis (Lowrie et al., 1999; Bonato et al., 2004). One of the arguments against taking this vaccine into clinical trial is the fact that hsp65 from *M. leprae* presents a high homology (55%) with its equivalent mammalian protein (Feige and van Eden, 1996). Theoretically, an anti-hsp65 immunity could trigger or worsen an autoimmune disease. In support of these arguments, many studies have shown immune responses against bacterial hsp65 in diabetes (Horváth et al., 2002), atherosclerosis (Keren et al., 2000) and arthritis (Cohen, 1991).

Multiple sclerosis (MS) afflicts more than 1 million individuals worldwide. It is an inflammatory, demyelinating and neurodegenerative disorder of the central nervous system (CNS) and is widely considered to be an autoimmune disease. Many experimental models are available but experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced by immunization of rodents with myelin proteolipid protein, myelin basic protein (MBP) or myelin oligodendrocyte glycoprotein, is currently widely adopted for immunological and therapeutic investigations (Arnett and Viney, 2007).

Recent findings indicate that different cell types as Th1, Th17, cytotoxic T cells, B cells and also T regulatory cells are involved in the inflammatory process present in MS and EAE (Holmøy and Hestvick, 2008).

The contribution of the immunity against hsp60/65 in MS and EAE is less investigated than in other autoimmune diseases. It is known, however, that hsps are constitutively expressed in normal CNS (oligodendrocytes, astrocytes and neurons), their expression also increases during inflammation and this increase seems to induce a specific immune response. Interestingly, antibodies to mycobacterial hsp bind to normal human myelin and to oligodendrocytes in MS demyelinating plaques (Birnbaum and Kotilinek, 1999). A few experimental studies indicated that hsp has a protective effect over EAE development (Birnbaum et al., 1996; Birnbaum et al., 1998).

Cytokines play an important role in the pathogenesis of inflammatory diseases including MS. A dual contribution of IFN- γ has been described in this

disease. As its expression increases during the peak of the disease and decreases during remission, IFN- γ has been more associated with sustained inflammation. However, it may also have regulatory functions that become more apparent in its complete absence (Imitola et al., 2005; Wheeler and Owens, 2005).

On the other hand, some cytokines as TGF- β and IL-10 play a protective role controlling excessive inflammation (Sojka et al., 2008). IL-10 has been clearly correlated with protection and recovery EAE (O'Neill et al., 2006; Prod'homme et al., 2007).

In this context, the present study was designed to determine the effect of a previous immunization with a genetic vaccine against TB (DNAhsp65) for tuberculosis on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

2. Material and Methods

2.1. Experimental design

Female Lewis rats were immunized with pVAXhsp65. Two weeks after last DNA dose they were either sacrificed to characterize the induced immune response or submitted to EAE induction by immunization with myelin. The effect of previous DNA immunization on EAE was evaluated by clinical follow-up (weight and clinical score), histopathological analysis of the central nervous system (CNS) and characterization of immunity against myelin. Non-immunized and pVAX (empty vector) injected animals were included as control groups.

2.2. Animals

Female Lewis rats (4-6 weeks old) of approximately 175 g were purchased from CEMIB (UNICAMP, São Paulo, SP, Brazil). The animals were fed with sterilized food and water *ad libitum* and were manipulated in accordance with the ethical guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The experimental protocol was approved by the local Ethics Committee (CEEA).

2.3. Genetic vaccine construction and purification

The vaccine pVAX-hsp65 was derived from the pVAX vector (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), previously digested with BamH I and Not I (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) by inserting a 3.3 kb fragment corresponding to the *M. leprae* hsp65 gene and the CMV intron A. The empty pVAX vector was used as a control. DH5 α *E. coli* transformed with plasmid pVAX or the plasmid carrying the hsp65 gene (pVAX-hsp65) were cultured in LB liquid medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) containing kanamycin (100 μ g/ml). The plasmids were purified using the Concert High Purity Maxiprep System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). Plasmid concentrations were determined by spectrophotometry at λ = 260 and 280 nm by using the Gene Quant II apparatus (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

2.4. Immunization with DNA vaccine

Lewis rats were injected by intramuscular route (quadriceps muscle) with 3 doses of pVAXhsp65 (300 μ g / 100 μ L / each dose), associated with 25% of saccharose. DNA doses were administered at 15 days interval. Control groups received the same volume of saline or the same concentration of pVAX (empty vector).

2.5. EAE induction and evaluation

EAE was induced as previously described (Harness et al., 2003). Briefly, rats were immunized with 50 μ g of myelin (Sigma) emulsified with Complete Freund's Adjuvant (CFA) containing 5 mg/mL of *Mycobacterium butyricum*. Animals were injected in the hind left footpad with 100 μ L of the emulsion and daily evaluated for weight loss and clinical score. Signs of disease were graded as 0 (zero): no disease; 1: loss of tonicity in the distal portion of the tail; 2: total loss of tail tonicity; 3: hind limb weakness (partial paralysis); 4: complete hind limb paralysis and urinary incontinence and 5: moribund.

2.6. Histological analysis of the Central Nervous System

The histological analysis was performed during recovery phase. After euthanasia and blood withdrawal, brain and cervical spinal cord samples were removed and fixed in 10% solution of buffered formalin. Paraffin slides (4-5 μm) were routinely stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed with a Leica microscope.

2.7. Anti-myelin and anti-hsp65 antibody levels

Serum samples were collected two weeks after DNA immunization or at the recovery phase after EAE induction and tested by ELISA for the presence of antibodies against rhsp65 and MBP, respectively. Briefly, plates were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of antigen in coating solution ($\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$; pH 9,6) overnight at 4°C. Non-specific antibody binding was blocked by incubation with 0,05% Tween 20, 10% fetal calf serum (FCS) in PBS (200 μL per well) for 1h at 37°C. Subsequently the plates were incubated overnight at 4°C with dilutions of serum samples from control and immunized rats. For the detection of specific serum IgG1 and IgG2b, the plates were incubated with biotinylated mouse anti-rat antibodies (Oxford Biotechnology). Plates were then incubated for 30 min at room temperature with Strept AB (kit from Dako, Carpinteria) and revealed by adding $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OPD}$ (Sigma). Color development was stopped with H_2SO_4 and optical density was measured at 492 nm.

2.8. *IFN- γ* and *IL-10* production

Normal and immunized rats were sacrificed two weeks after DNA immunization or at the recovery EAE phase. Lymph node (popliteal + inguinal) or splenic cells were collected and adjusted to $2,5 \cdot 10^6/\text{mL}$ or $5 \cdot 10^6/\text{mL}$, respectively. Cells were cultured in complete RPMI medium (RPMI supplemented with 5% FCS, 20mM glutamine and 40 IU/mL of gentamicin), in the presence of myelin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), rhsp65 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or Concanavalin A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cytokine levels in culture supernatants were evaluated 48h later by ELISA according to manufacturer

instructions (R&D Systems). Ninety-six well plates (NUNC) were coated with capture antibodies for IFN- γ (DY 585) or IL-10 (DY 522) diluted in PBS at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Plates were incubated overnight and then blocked during 2h with 1% albumin in PBS. Standard rat cytokines and culture supernatants were added and the plates incubated during 2h. Biotinylated anti-IFN- γ and anti-IL-10 were added (150 and 100 ng/mL, respectively) and plates incubated for additional 2h at room temperature. Plates were incubated at room temperature for 30 minutes with Streptavidin and then revealed by adding H_2O_2 + OPD (Sigma). Color development was stopped with H_2SO_4 and optical density was measured at 492 nm.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis were performed using SigmaStat statistical software (Jandel Corp., San Rafael, CA). The Kruskal-Wallis nonparametric test was used to compare the antibody production. Cytokine data was expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and tested for statistical significance by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. *pVAXhsp65* vaccination induces a *Th1* profile in Lewis rats

This immunization protocol was able to induce significant levels of IgG2b but not IgG1 (figure 1). The empty vector did not induce antibody production.

No IL-4 or IL-10 were detected in spleen cell cultures from rats immunized with *pVAXhsp65* (not shown). However, a significant production of IFN- γ was clearly observed in cultures from vaccinated rats re-stimulated in vitro with recombinant hsp65, in comparison to animals injected with *pVAX* or saline (figure 1c). As expected, similar high levels of IFN- γ were induced by ConA in the three experimental groups (not shown).

3.2. Previous pVAXhsp65 vaccination did not modify clinical EAE development

EAE development caused, as expected, a weight loss that varied from 10 to 15 %. The previous vaccination or vector injection did not affect this parameter, nor in the acute neither in the remission phase. These results are showed in figure 2a. The previous contact with vector or vaccine also did not affect the clinical scores that varied from 2 to 4 as documented at figure 2b.

3.3. pVAXhsp65 prevents inflammatory infiltration in the brain

The severity of the inflammatory reaction in the brain of the control group with EAE, clearly correlated with the observed clinical symptoms. Brain sections showed typical inflammatory foci, dominated by mononuclear cells and localized around small vessels. Blood vessels were dilated and filled with erythrocytes. A very distinct picture was observed in animals that were previously immunized with the vaccine or injected with the vector. No inflammation was present in these sections, resembling the normal structure observed in animals without EAE. These results can be observed in figure 3.

Sections from spinal cord were also evaluated. Typical inflammatory foci were observed in cervical section derived from control animals with EAE. In a general way, visual inspection suggested that spinal cord inflammation was also decreased or modified (inflammatory cells seem to be more restricted to the vascular bed) by previous inoculation with vaccine or vector. These results can be observed in figure 4.

3.4. DNA modulates anti-myelin immune response

Myelin immunization, as expected, induced a significant production of both, IgG1 and IgG2b anti-myelin antibodies. Previous inoculation of both, vaccine and vector, decreased specific IgG1 but not IgG2b production as can be observed in figure 5.

IFN- γ production by splenic cells from EAE animals, re-stimulated with myelin in vitro, was significant comparing to control (without EAE) animals. These levels were not altered by previous contact with DNA. However, IFN- γ levels

induced by ConA were significantly decreased in animals that were previously injected with DNA (vaccine and vector). These findings are showed in figure 6 (a and b, respectively).

DNA inoculation also modulated IL-10 production. Lower levels of this cytokine were detected in lymph node cultures stimulated with myelin or ConA. The decrease in animals injected with the vaccine was more pronounced than in the ones injected with the vector. These results can be observed in figure 6 (c in myelin and d in ConA stimulated cultures).

4. Discussion

In this investigation we evaluated if a previous vaccination with pVAXhsp65, that is a protective vaccine in experimental tuberculosis, could affect the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. In preliminary assays we observed that a vaccination schedulee employing 3 pVAXhsp65 doses of 100 µg/each by intramuscular route, that is able to induce protective immunity in both, mice and guinea pigs (Lima et al., 2003; de Paula et al., 2007), was not inducing a detectable immune response (results not shown). A higher DNA amount was then tested because literature reports have emphasized the requirement of higher DNA concentrations to induce immunity in bigger animals (Xiao et al., 2007; Yu et al., 2007). Lewis rats were therefore immunized with 3 pVAXhsp65 doses (300 µg each dose) by the same route. In this case a significant amount of IFN- γ was specifically induced by rhsp65 in immunized animals. Interestingly, IgG2b but not IgG1 antibodies were also induced. In rats the IgG2b isotype has opsonizing ability and is, therefore, associated with Th1 polarization (Gracie and Bradley, 2006). Normal rats or rats injected with pVAX did not produce anti-hsp65 antibodies nor IFN- γ upon *in vitro* stimulation with rhsp65. These results suggested, therefore, that pVAXhp65 by i.m route in Lewis rats induced a predominantly Th1 immune response that is the most common and expected immunity induced by genetic vaccines through this route (Gurunathan et al., 2000).

A Th1 response to hsp65 could theoretically contribute to accelerate or worsen EAE. This assumption is based on the fact that Th1 lymphocytes, mainly

by producing IFN- γ , are key cells involved in the pathogenesis of EAE and MS (Mustafa et al., 1991; Imitola et al., 2005). A few reports have also detected the presence of humoral and cellular anti-hsp65 immune response during MS and EAE (Birnbaum, 1995; Birnbaum & Kotilinek, 1999). In addition, bacterial DNA and oligodeoxynucleotides, with contain CpG motifs, have been reported to enhance immunostimulation, determining exacerbation of autoimmune animal models for MS (Tsunoda et al., 1999; Segal et al., 2000).

In this context, one important contribution of this work was the demonstration that the previous immunization with pVAXhsp65 or injection of the empty vector, did not deleteriously affect the clinical EAE development induced by immunization with myelin plus Complete Freund's Adjuvant (CFA). This was initially demonstrated by the very similar clinical evolution of the disease in DNA vaccinated and non-vaccinated animals. They equally lost weight, average clinical score was the same and acute and remission phases occurred at comparable time periods. This was further confirmed by histopathological findings that did not show any signs of augmented inflammation. These results were considered very promising having in mind the use of DNAhsp65 as a vaccine to protect or to treat tuberculosis because they suggest that vaccination with this construct would not be a triggering or worsening factor in MS cases.

Even though this possible deleterious effect was an important concern in this investigation, a protective activity of this vaccine over EAE development was even expected. This assumption was based on both, our previous experience with the effect of this vaccine on other models of experimental autoimmunity as arthritis and diabetes (Santos-Junior et al., 2005; Santos Júnior et al., 2007) and also on the ability of heat shock proteins to induce Treg cells. Heat shock proteins (hsp), specially hsp65 are possible targets for regulatory T cells due to their enhanced expression in inflamed tissues and strong evidences that they are able to induce anti-inflammatory immunoregulatory T cells responses (van Eden et al., 2005; van Eden et al., 2007).

As we stated before, the previous injection of DNA did not affect the clinical parameters (weight and clinical score) that are usually used to characterize the clinical development of EAE. However, both DNA (empty vector or vaccine) preparations clearly decreased intensity of the inflammatory infiltrates in the brain. In addition, inflammatory infiltration changed in cervical spinal cord sections. In this

case, a smaller degree of inflammation associated with a more limited distribution of inflammatory cells (inside the vascular bed) was detected in animals that were injected with pVAX or pVAXhsp65.

The mechanism of this differential protective effect over the brain and the spinal cord was not investigated. Having in mind that interaction of circulating leukocytes with the endothelium of both, blood-brain and blood-spinal cord barriers, is a critical step in inflammatory diseases of the CNS, we could hypothesize that differences in adhesion molecules, chemokines on their receptors could explain this finding (Engelhardt, 2006).

Interestingly, this anti-inflammatory activity was associated with a clear immunomodulatory effect over both, the humoral and the cellular immune response. This modulation was characterized by less IgG1 anti-myelin production and, more interestingly, a decreased production of IFN- γ and IL-10 by cells from secondary lymphoid organs. This modulatory effect observed on cytokine production could explain the reduced inflammation. Even though IFN- γ is best known on MS and EAE by its role on immunopathogenesis (Willenborg et al., 1996; Imitola et al., 2005; Xiao et al., 2008), recent studies indicate that it may not be the major detrimental factor and may even have a regulatory function (Wheeler and Owens, 2005). This possibility is highly reinforced by previous reports on EAE itself and by very recent investigations on the arthritis model. By using an IFN- γ receptor KO mice as an EAE model, Willenborg et al., 1999, demonstrated that this cytokine was critical to the control of the disease. These findings were further confirmed and the mechanism of this protection was partially elucidated. IFN- γ shapes the immune invasion of the CNS by regulating chemokine expression and also increases apoptosis at T cells that infiltrate the CNS (Tran et al., 2000; Furlan et al., 2001). This regulatory ability of IFN- γ , together with TNF- α , was recently reviewed by Kim and Moudgil, 2008, with a special emphasis to an adjuvant arthritis (AA) experimental model. According to them, a specific threshold of IFN- γ and TNF- α is required for the initiation of autoimmune diseases. However, above a certain level, these cytokines trigger regulatory mechanisms that suppress the ongoing disease. Very interesting and highly concerned with the immunogen (hsp65) employed in our investigation, are the results obtained by Durai et al., 2007. These authors downmodulated AA in Lewis rat by pretreating them with an

arthritogenic determinant derived from hsp65. Noteworthy are earlier findings by Paul et al., 2000 and Quintana et al., 2002 showing that these antigen specific T cells were able to produce both, IFN- γ and IL-10. In this context, we believe that the reduction of IFN- γ and IL-10 observed in peripheral lymphoid organs, showed in our work, is due to a migration of these cells to the CNS where, somehow they control trafficking or determine apoptosis of encephalitogenic T cells.

An intriguing fact is that these cells that we suppose to be migrating to the CNS seem to be two distinct populations: one that is specific for myelin and produce IL-10 but not IFN- γ and other that seem to produce much higher IFN- γ and IL-10 levels but is not specific to myelin. One important question that also needs further elucidation is the similar modulatory effect of pVAX and pVAXhsp65. No statistic difference was observed between them but we think that there is a tendency for a higher effect on pVAXhsp65 vaccinated animals. We expect to disclose this finding by using another rodent model of EAE as C57BL/6 mice that mimetizes MS better than Lewis rats and that showed a clear reduction in both, brain inflammation and clinical severity, when submitted to an stress response (Heneka et al., 2001).

Even though the anti-inflammatory effect observed in the brain was clear, it could be considered less expressive when compared with our earlier findings in arthritis and diabetes experimental models. By using mice selected for maximal inflammatory reaction (AIRmax), we observed that immunization with DNAhsp65 or the corresponding vector did not trigger arthritis whereas pristane injection resulted in a 62% incidence of this disease. In addition, administered after pristane, DNAhsp65 significantly down-regulated arthritis incidence in AIRmax animals. This protective effect was associated with down-regulation of IL-6 and IL-12 and concomitant up-regulation of IL-10 (Santos-Junior et al., 2005). This vaccine also prevented progression to severe diabetes in NOD mice that present a spontaneous and progressive pancreas insulitis associated with high glucose levels. This effect that was much more pronounced with pVAXhsp65 than with the empty vector, was associated with a clear shift in the cellular infiltration pattern in the pancreas. This change included reduction of CD4+ and CD8+ T cells infiltration, appearance of CD25+ cells influx and increased staining for IL-10 in the islets (Santos Júnior et al., 2007).

If this more discrete protection observed in EAE is due to the fact that Lewis rats develop an acute self-cured disease, compared to the chronic progression characteristic of the arthritis and diabetes models studied, remains to be elucidated.

The results obtained in this investigation show that the homology of this vaccine (hsp65) with its counterpart in mammals (hsp60) is not triggering or worsening experimental encephalomyelitis in Lewis rats that are described as an adequate model to study MS. Together with our previous investigations in arthritis and diabetes, these results highly suggest that this vaccine will not be a triggering or worsening factor for autoimmune diseases, being therefore safe in this aspect to be submitted to clinical trials.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) that supported this study with grants.

References

1. Andersen, P., Doherty, T.M., 2005. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 656-662.
2. Arnett, H.A., Viney, J.L., 2007. Considerations for the sensible use of rodent models of inflammatory disease in predicting efficacy of new biological therapeutics in the clinic. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 59, 1084-1092.
3. Birnbaum, G., 1995. Stress proteins: their role in the normal central nervous system and in disease states, especially multiple sclerosis. Springer. *Semin. Immunopathol.* 17, 107-118.
4. Birnbaum, G., Kotilinek, L., Schlievert, P., Clark, H.B., Trotter, J., Horvath, E., Gao, E., Cox, M., Braun, P.E., 1996. Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): I. Immunization with a peptide of the myelin protein 2',3' cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase that is cross-reactive with a heat shock protein alters the course of EAE. *J. Neurosci. Res.* 44, 381-396.

5. Birnbaum, G., Kotilinek, L., Miller, S.D., Raine, C.S., Gao, Y.L., Lehmann, P.V., Gupta, R.S., 1998. Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis. II: environmental infection and extra-neuraxial inflammation alter the course of chronic relapsing encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 90, 149-161.
6. Birnbaum, G., Kotilinek, L., 1999. Immunity to heat shock proteins and neurological disorders of women. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 7, 39-48.
7. Bonato, V.L., Lima, V.M., Tascon, R.E., Lowrie, D.B., Silva, C.L., 1998. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* - infected mice. *Infect. Immun.* 66, 169-175.
8. Bonato, V.L., Gonçalves, E.D., Soares, E.G., Santos Júnior, R.R., Sartori, A., Coelho-Castelo, A.A., Silva, C.L., 2004. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction in lung injury. *Immunology.* 113, 130-138.
9. Cohen, I.R., 1991. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 567-589.
10. Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S., Wilson, M.E., Burdick, E., Fineberg, H.V., Mosteller, F., 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* 271, 698-702.
11. de Paula, L., Silva, C.L., Carlos, D., Matias-Peres, C., Sorgi, C.A., Soares, E.G., Souza, P.R., Blades, C.R., Galleti, F.C., Bonato, V.L., Goncalves, E.D., Silva, E.V., Faccioli, L.H., 2007. Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Genet. Vaccines. Ther.* 24, 5:2.
12. Durai, M., Kim, H.R., Bala, K., Moudgil, K.D., 2007. T cells against the pathogenic and protective epitopes of heat-shock protein 65 are crossreactive and display functional similarity: novel aspect of regulation of autoimmune arthritis. *J. Rheumatol.* 34, 2134-2143.
13. Engelhardt, B., 2006. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J. Neural. Transm.* 113, 477-485.
14. Ernst, J.D., Trevejo-Nunez, G., Banaiee, N., 2007. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Invest.* 117, 1738-1745.

15. Feige, U., van Eden, W., 1996. Infection, autoimmunity and autoimmune disease. *EXS.* 77, 359-373.
16. Furlan, R., Brambilla, E., Ruffini, F., Poliani, P.L., Bergami, A., Marconi, P.C., Franciotta, D.M., Penna, G., Comi, G., Adorini, L., Martino, G., 2001. Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* 167, 1821-1829.
17. Gracie, J.A., Bradley, J.A., 1996. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur. J. Immunol.* 26, 1217-1221.
18. Gurunathan, S., Klinman, D.M., Seder, R.A., 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 927-974.
19. Harness, J., Cavanagh, A., Morton, H., McCombe, P., 2003. A protective effect of early pregnancy factor on experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rats by inoculation with myelin basic protein. *J. Neurol. Sci.* 216, 33-41.
20. Heneka, M.T., Sharp, A., Murphy, P., Lyons, J.A., Dumitrescu, L., Feinstein, D.L., 2001. The heat shock response reduces myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J. Neurochem.* 77, 568-579.
21. Holmøy, T., Hestvik, A.L., 2008. Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 271-278.
22. Horváth, L., Cervenak, L., Oroszlán, M., Prohászka, Z., Uray, K., Hudecz, F., Baranyi, E., Madácsy, L., Singh, M., Romics, L., Füst, G., Pánczél, P., 2002. Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. *Immunol. Lett.* 80, 155-162.
23. Imitola, J., Chitnis, T., Khoury, S.J., 2005. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol. Ther.* 106, 163-177.
24. Keren, P., George, J., Shaish, A., Levkovitz, H., Janakovic, Z., Afek, A., Goldberg, I., Kopolovic, J., Keren, G., Harats, D., 2000. Effect of hyperglycemia and hyperlipidemia on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice: establishment of a combined model and association with heat shock protein 65 immunity. *Diabetes.* 49, 1064-1069.

25. Kim, E.Y., Moudgil, K.D., 2008. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. *Immunol. Lett.* 120, 1-5.
26. Lima, K.M., dos Santos, S.A., Santos, R.R., Brandão, I.T., Rodrigues, J.M. Jr, Silva, C.L., 2003. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *Vaccine.* 22, 49-56.
27. Lowrie, D.B., Tascon, R.E., Bonato, V.L., Lima, V.M., Faccioli, L.H., Stavropoulos, E., Colston, M.J., Hewinson, R.G., Moelling, K., Silva, C.L., 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature.* 400, 269-271.
28. Mustafa, M.I., Diener, P., Höjeberg, B., van der Meide, P., Olsson, T., 1991. T cell immunity and interferon- γ secretion during experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 31, 165-177.
29. O'Neill, E.J., Day, M.J., Wraith, D.C., 2006. IL-10 is essential for disease protection following intranasal peptide administration in the C57BL/6 model of EAE. *J. Neuroimmunol.* 178, 1-8.
30. Paul, A.G., van Kooten, P.J., van Eden, W., van der Zee, R., 2000. Highly autoproliiferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN-gamma and are protective in adjuvant arthritis. *J. Immunol.* 165, 7270-7277.
31. Prod'homme, T., Weber, M.S., Zamvil, S.S., 2007. T effectors outfox T regulators in autoimmunity. *Nat. Med.* 13, 411-413.
32. Quintana, F.J., Carmi, P., Mor, F., Cohen, I.R., 2002. Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60. *J. Immunol.* 169, 3422-3428.
33. Santos-Junior, R.R., Sartori, A., De Franco, M., Filho, O.G., Coelho-Castelo, A.A., Bonato, V.L., Cabrera, W.H., Ibañez, O.M., Silva, C.L., 2005. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. *Hum. Gene. Ther.* 16, 1338-1345.
34. Santos Júnior, R.R., Sartori, A., Bonato, V.L., Coelho Castelo, A.A., Vilella, C.A., Zollner, R.L., Silva, C.L., 2007. Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 570-578.

35. Segal, B.M., Chang, J.T., Shevach, E.M., 2000. CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J. Immunol.* 164, 5683-5688.
36. Sojka, D.K., Huang, Y.H., Fowell, D.J., 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 124, 13-22.
37. Tran, E.H., Prince, E.N., Owens, T., 2000. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J. Immunol.* 164, 2759-2768.
38. Tsunoda, I., Tolley, N.D., Theil, D.J., Whitton, J.L., Kobayashi, H., Fujinami, R.S., 1999. Exacerbation of viral and autoimmune animal models for multiple sclerosis by bacterial DNA. *Brain. Pathol.* 9, 481-493.
39. van Eden, W., van der Zee, R., Prakken, B., 2005. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 318-330.
40. van Eden, W., Wick, G., Albani, S., Cohen, I., 2007. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 113, 217-237.
41. Wheeler, R.D., Owens, T., 2005. The changing face of cytokines in the brain: perspectives from EAE. *Curr. Pharm. Des.* 11, 1031-1037.
42. Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowden, W.B., Ramshaw, I.A., 1996. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 157, 3223-3227.
43. Willenborg, D.O., Fordham, S.A., Staykova, M.A., Ramshaw, I.A., Cowden, W.B., 1999. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J. Immunol.* 163, 5278-5286.
44. Xiao, J., Li, S., Wang, W., Li, Y., Zhao, W., 2007. Protective effects of overexpression TCR V β 5.2 HSP70 and TCR V β 8.2-HSP70 against collagen-induced arthritis in rats. *Cell. Mol. Immunol.* 4, 439-445.
45. Xiao, B.G., Ma, C.G., Xu, L.Y., Link, H., Lu, C.Z., 2008. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Immunol.* 45, 1191-1196.

46. Yu, P., Huang, L., Zou, J., Zhu, H., Wang, X., Xu, X.M., Lu, P.H., 2007. DNA vaccine against NgR promotes functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Brain. Res.* 1147, 66-76.

Legends

Fig. 1. Immune response induced by pVAXhsp65 vaccination in Lewis rats. Animals received 3 pVAXhsp65 doses (300 µg each) and 15 days after last dose they were euthanized. Control groups received saline or pVAX. IgG1 (a) and IgG2b (b) anti-hsp65 were determined in the serum. IFN- γ production by splenic cells was determined after in vitro stimulation with rshp65. Antibody values are represented by medians and interquartile ranges and cytokine levels by means \pm standard error of the mean (SEM) for 4-6 animals. * $p < 0.05$ in comparison to control groups.

Fig. 2. Effect of immunization with pVAXhsp65 on clinical EAE development in Lewis rats. Animals previously immunized with pVAXhsp65 or injected with the empty vector (pVAX) or saline were inoculated with myelin basic protein (MBP) emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA) and daily evaluated. Weight (a) and clinical score (b) during acute and remission phases. Data are presented by mean \pm SEM for 4-6 rats.

Fig. 3. Effect of immunization with pVAXhsp65 on brain inflammation in Lewis rats submitted to EAE induction. Animals previously immunized with pVAXhsp65 or injected with the empty vector (pVAX) or saline were inoculated with MBP emulsified with CFA. Inflammation was evaluated in brain sections, stained with H&E, during the remission phase (day 20th). Control animals without EAE (a), control animals with EAE (b), immunization with pVAXhsp65 before EAE (c), inoculation of pVAX before EAE (d).

Fig. 4. Effect of immunization with pVAXhsp65 on cervical spinal cord inflammation in Lewis rats submitted to EAE induction. Animals previously immunized with pVAXhsp65 or injected with the empty vector (pVAX) or saline were inoculated with MBP emulsified with CFA. Inflammation was evaluated in cervical spinal cord sections, stained with H&E, during the remission phase (day 20th). Control animals without EAE (a), control animals with EAE (b), immunization with pVAXhsp65 before EAE (c), inoculation of pVAX before EAE (d).

Fig. 5. Effect of immunization with pVAXhsp65 on humoral anti-myelin immune response in Lewis rats submitted to EAE induction. Animals previously immunized with pVAXhsp65 or injected with the empty vector (pVAX) or saline were inoculated with MBP emulsified with CFA. Blood samples were collected during remission phase (day 20th) and IgG1 (a) and IgG2b (b) anti-myelin antibodies were determined by ELISA. Data are presented by medians and interquartile ranges for 4-6 animals.

Fig. 6. Effect of immunization with pVAXhsp65 on cellular anti-myelin immune response in Lewis rats submitted to EAE induction. Animals previously immunized with pVAXhsp65 or injected with the empty vector (pVAX) or saline were inoculated with MBP emulsified with CFA. IFN- γ was evaluated in splenic cell supernatants stimulated with myelin (a) or ConA (b). IL-10 was evaluated in lymph node cell supernatants stimulated with myelin (c) or ConA (d). Data are presented by mean \pm SEM for 4-6 animals. * $p < 0.05$ in comparison to other groups.

Figure 1

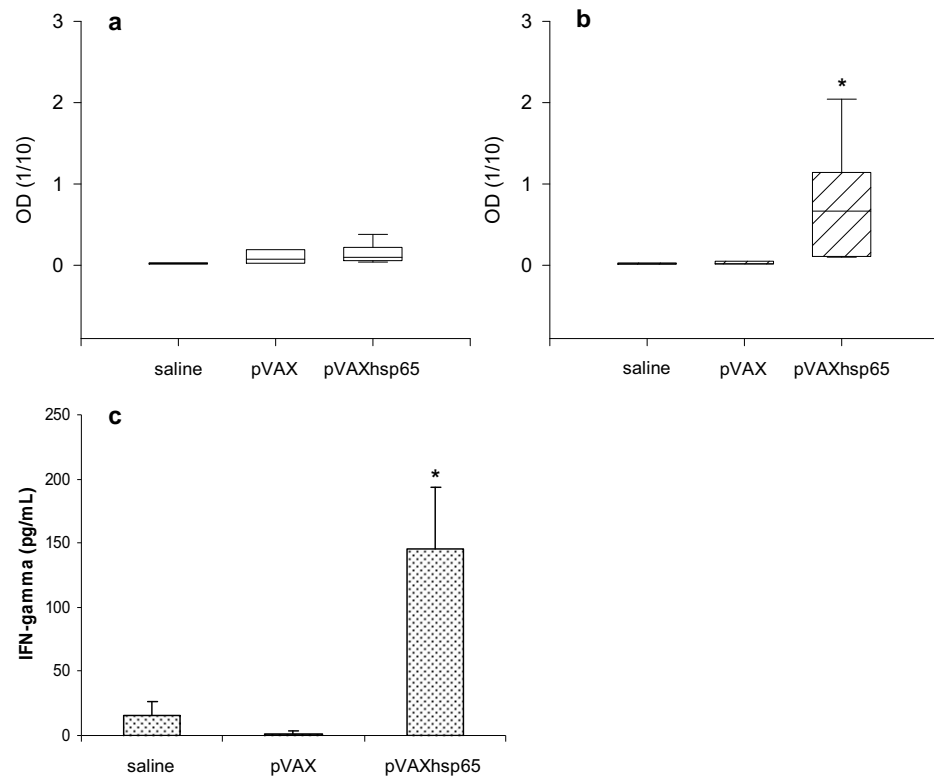


Figure 2

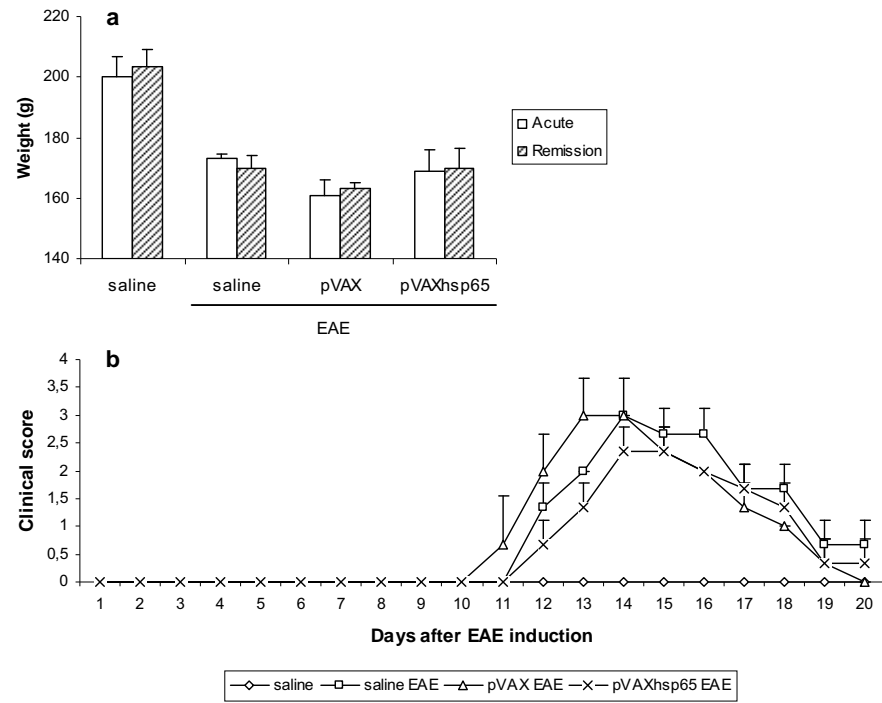


Figure 3

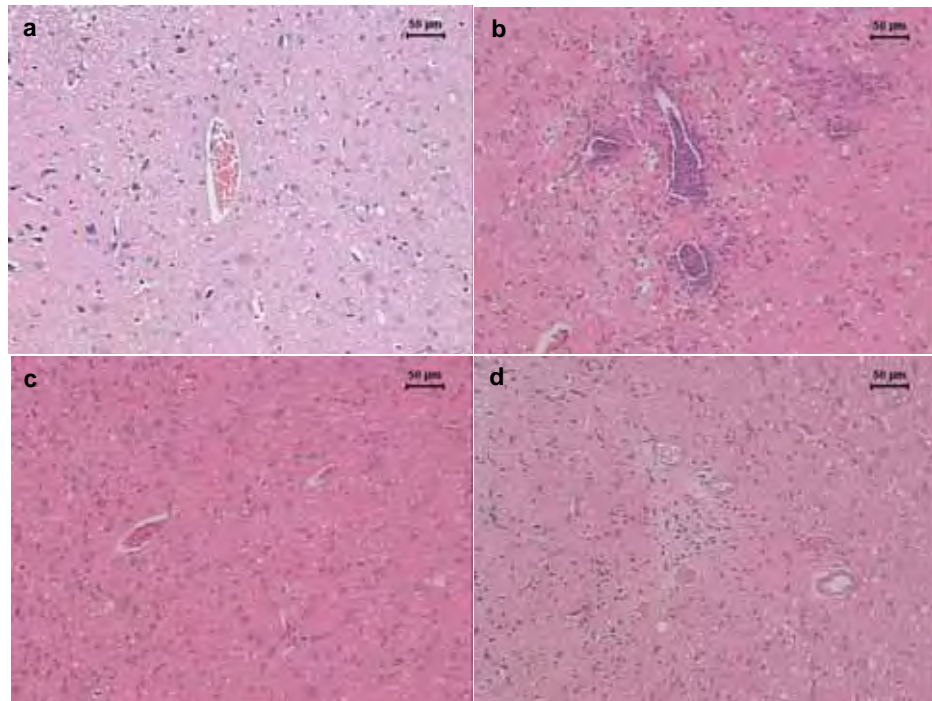


Figure 4

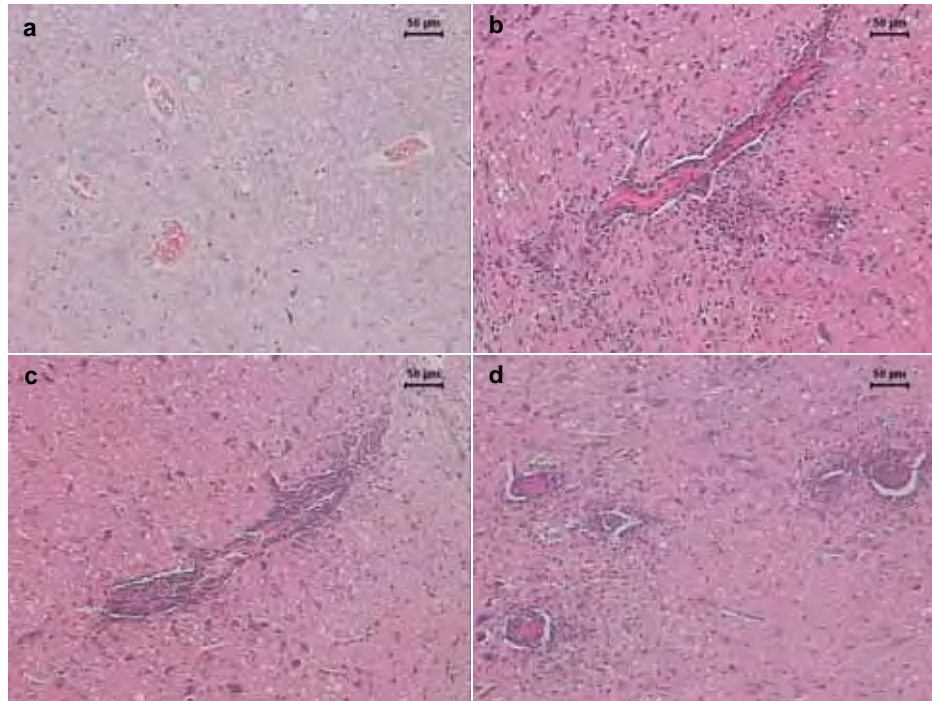


Figure 5

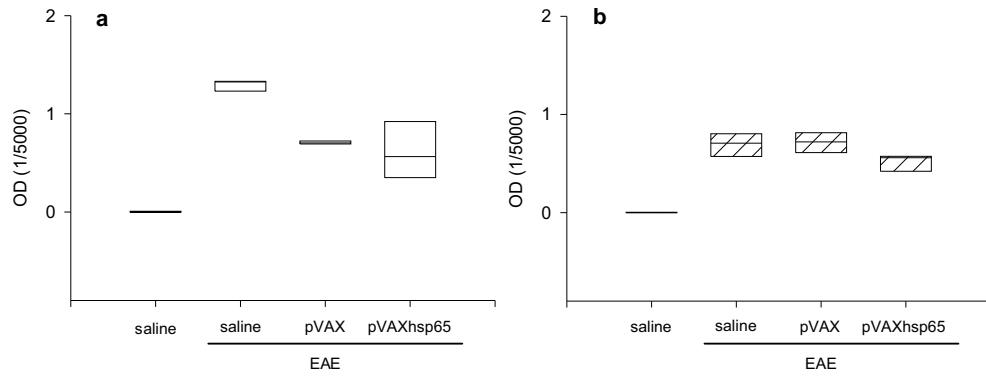


Figure 6

