

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**EFEITO MODULADOR DA ESTRATÉGIA VACINAL BCG/DNA<sub>hsp65</sub>  
NA ENCEFALITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)**

**Clara Pires Fujiara Guerino**

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Botucatu - SP  
2008

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*

Guerino, Clara Pires Fujiara.

Efeito modulador da estratégia vacinal BCG/DNAhsp65 na encefalite autoimune experimental(EAE) / Clara Pires Fujiara Guerino. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella

1. Encefalite - Aspectos imunológicos 2. Vacina 3. Imunologia

Palavras-chave: BCG; Encefalite autoimune experimental (EAE); hsp65; Imunomodulação; Vacina gênica

*Epígrafe*

*“Saber o que todos sabem é não saber nada.”*

*Remy Gourmont*

## A GRADEÇO . . .

Em primeiro lugar à minha família pelo apoio velado, pelas privações passadas e pela paciência que sempre tiveram.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alexandrina Sartori por ter me aceitado em seu laboratório e acreditar em mim apesar das minhas incertezas, orientando-me ao longo deste caminho e nessa jornada maior que é a vida.

À Sofia, minha co-orientadora, por estar sempre ao meu lado, ensinando, observando, corrigindo e perdoadando meus erros, enquanto eu temerosamente caminhava sozinha.

Às meninas do laboratório, Fernanda, Larissa (Dutra), Larissa (Aku), Sofia e Thaís, e também aos meninos, Nelson e Raphael (Panda), pelos ensinamentos, pela ajuda ou simplesmente pela companhia, fazendo do laboratório um lugar super agradável de se trabalhar.

A Marina, Tao, Borbs, Enéas, Urucu, Tainha, Leg e tantas outras pessoas por terem feito bem mais divertidas as horas que passei na minha casinha aqui em Botucatu.

À Fungueth, Simone, Kyoto, Tomo, Taku, Kibe, Bereba, Mika, Kib's por me agüentarem tanto tempo sob o mesmo telhado, sempre perturbando...e também à Tsu, Krinha, Frangote, Coce e o Kuika. Muito obrigada a todos vocês por terem me dado a honra dessa incrível companhia por muitas e muitas horas ao longo desses quatro anos.

Ao Kita por me dar apoio (e comidas gostosas), a Cat pelas conversas, a Toko pelas risadas, e a todo o povo da ARCA/2008 por sua presença, esse ano não seria o mesmo sem vocês!

A todos que me ajudaram ao longo desse ano, deixo meus sinceros agradecimentos,

Muito obrigada!



Tanto o BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) quanto a DNAhsp65 são vacinas contra tuberculose, porém além da atividade protetora desejável ambas apresentam atividade imunomoduladora. Seguindo a linha de pesquisa de nosso laboratório que investiga a atividade da DNAhsp65 sobre doenças autoimunes, avaliamos o efeito da associação destas vacinas sob a forma de uma estratégia vacinal tipo *prime-boost* (*priming* com BCG seguida de *booster* com DNAhsp65), sobre o desenvolvimento da Encefalite Autoimune Experimental (EAE), que é modelo animal de esclerose múltipla.

Ratos Lewis fêmeas foram divididos em grupos de 5 a 6 animais (salina, BCG, EAE, BCG/EAE, BCG/vetor/EAE e BCG/vacina/EAE) e imunizados em intervalos de 15 dias. Os animais receberam um *priming* com  $2 - 10 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias de BCG subcutâneo seguido de dois *boosters* com 300 µg de pVAXhsp65 numa solução de sacarose 25% por via intramuscular. A EAE foi induzida 15 dias após a última imunização, por inoculação de 25 µg de proteína básica de mielina (MBP) associada ao Adjuvante Completo de Freund contendo *Mycobacterium butyricum*. Aqueles que não receberam os inóculos descritos foram injetados com salina, exceto o grupo BCG/vetor/EAE que recebeu 300 µg de pVAX (vetor plasmidial vazio) também em solução de sacarose. Os animais foram acompanhados diariamente até serem submetidos à eutanásia, 3 semanas mais tarde, durante a fase de recuperação da doença para avaliação da resposta imune, escore clínico e presença de infiltrado inflamatório no SNC.

A evolução clínica da EAE foi similar entre animais vacinados e não vacinados, mas a análise histopatológica revelou que a imunização prévia com BCG ou BCG/DNAhsp65 diminuiu o processo inflamatório. No cérebro foi observada redução acentuada do processo inflamatório nos grupos BCG/EAE, BCG/vetor/EAE e BCG/vacina/EAE. No caso das medulas cervical e torácica o processo inflamatório foi acentuado, similar ao observado no grupo salina/EAE. Na região lombar da medula ocorreu menor inflamação nos grupos BCG/EAE e BCG/vacina/EAE, mas não no grupo BCG/vetor/EAE. Este efeito anti-inflamatório foi acompanhado de um efeito modulador sobre a resposta imune anti-mielina; a DNAhsp65, mas não o BCG, determinou aumento significativo nos níveis de IgG1 anti-mielina, isotipo associado ao padrão Th2 e considerado protetor na EAE quando comparado à IgG2b (padrão Th1). A inoculação de BCG, BCG/vetor e BCG/DNAhsp65, foi associada a um efeito modulador negativo, embora estatisticamente não significativo, sobre a produção de IFN- $\gamma$  e de IL-10 induzidas por MBP sugerindo, portanto, uma possível migração dessas células para o SNC onde está ocorrendo o ataque autoimune.

A estratégia *prime-boost* (BCG/DNAhsp65) não determinou efeito deletério (aceleração ou agravamento) na EAE. Ao contrário, este esquema determinou efeito parcialmente protetor na EAE, impedindo o processo inflamatório no cérebro.

**Palavras-chave:** BCG, Encefalite Autoimune Experimental (EAE), hsp65, imunomodulação, vacina gênica.

SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	pag 6
1.1 Esclerose múltipla (EM).....	pag 6
1.2 Encefalite autoimune experimental (EAE).....	pag 7
1.3 Proteínas de choque térmico.....	pag 7
1.3.1 Aspectos gerais e regulação da autoimunidade.....	pag 7
1.3.2 Participação da hsp60/hsp65 na EM e na EAE.....	pag 9
1.4 Vacinas para tuberculose.....	pag 10
1.5 Efeito imunomodulador de vacinas para tuberculose em doenças autoimunes.....	pag 11
<b>2. Objetivo</b> .....	pag 14
<b>3. Protocolo Experimental</b> .....	pag 15
<b>4. Material e Métodos</b> .....	pag 16
4.1 Animais.....	pag 16
4.2 Imunização: estratégia <i>prime-boost</i> (BCG/DNAhsp65).....	pag 16
4.3 Indução da EAE.....	pag 17
4.4 Eutanásia.....	pag 17
4.5 Cultura celular.....	pag 17
4.6 ELISA para detecção de citocinas.....	pag 18
4.7 ELISA para detecção de anticorpos (anti-hsp65 e anti-MBP).....	pag 18
4.8 Análise histopatológica.....	pag 19
4.9 Análise estatística.....	pag 19
<b>5. Resultados</b> .....	pag 21
5.1 Imunogenicidade do BCG.....	pag 21
5.2 Imunogenicidade da DNAhsp65.....	pag 22
5.3 Efeito da estratégia BCG/DNAhsp65 na resposta imune anti-mielina .....	pag 24
5.4 Efeito da estratégia BCG/DNAhsp65 sobre o desenvolvimento da EAE.....	pag 27
<b>6. Discussão</b> .....	pag 34
<b>7. Conclusão</b> .....	pag 37
<b>8. Referências</b> .....	pag 38

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença desmielinizante, inflamatória e crônica do Sistema Nervoso Central (SNC). Caracteriza-se como a principal causa de incapacidade neurológica em adultos jovens e estima-se que haja de 1 a 2,5 milhões de indivíduos que sofram de EM no mundo. Europa, Canadá e Estados Unidos estão entre as regiões de maior frequência, tendo de 50-100 casos de EM por 100.000 habitantes. Ásia, África e América do Sul possuem uma frequência de 5 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2004). Esta doença apresenta substanciais custos econômicos, pessoais e sociais (Imitola et al., 2005). A maioria dos pacientes apresenta um quadro transitório de sintomas com recidivas da doença seguidos por uma fase secundária progressiva, caracterizada por neurodegeneração.

Sua patogênese é bem mais complicada que o predito por estudos anteriores com modelo experimental, ela se inicia com a formação de lesões inflamatórias agudas clinicamente silenciosas mediadas por células CD4+ do perfil Th1 específicas para proteínas da mielina. Acompanhando estas lesões há um processo degenerativo que inclui perda de axônios nas lesões, dano difuso da substância branca em áreas distantes das evidenciadas por histopatologia e ressonância magnética, além de envolvimento da substância cinzenta cortical e profunda (McFarland & Martin, 2007). Como em muitas doenças autoimunes, as citocinas desempenham um papel importante no processo inflamatório e na conseqüente degeneração (Lucchinetti et al. 2000). Inicialmente foi pensado que células produtoras de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) estivessem mediando a doença, mas evidências indicam que uma linhagem de células T produtoras de interleucina 17 (IL-17) de fenótipo distinto do Th1 e Th2 também parece apresentar um papel crítico para o desenvolvimento da inflamação e da doença. (McFarland & Martin, 2007).



## 1.2. ENCEFALITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

A Encefalite Autoimune Experimental (EAE) é considerada um modelo animal para a esclerose múltipla em humanos. Esta doença pode ser induzida em ratos e outras espécies de animais suscetíveis pela imunização com antígenos derivados de mielina associados ao 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 por células T (Link & Xiao, 2001). A EAE no rato é um modelo bastante indicado para investigar esta patologia sendo que uma única inoculação com homogenato de medula espinhal, mielina ou peptídeos encefalitogênicos derivados de mielina, como a MBP-86, associados ao ACF resultam em uma incidência da doença de quase 100%. Em ratos da cepa Lewis ela é caracterizada como uma doença aguda, grave e monofásica com recuperação espontânea. A gravidade da EAE tem sido relacionada com a dose de micobactérias presentes no inóculo; MBP associada com altas doses induz doença grave enquanto que baixas doses desencadeia doença mais discreta. Todos os ratos imunizados mostram infiltração ostensiva de células T no SNC, acompanhada de ativação da micróglia (Namer et al., 1998). As características histopatológicas da EAE no rato Lewis incluem infiltração mononuclear meníngea, perivascular e parenquimal no SNC (Link & Xiao, 2001). O processo inflamatório contra componentes da mielina pode levar a uma perda neuronal aguda por apoptose. Além de sua grande utilidade para desvendar os mecanismos imunológicos envolvidos na EM, este modelo também vem sendo empregado para investigar possíveis abordagens terapêuticas como indução de tolerância por via oral (Liu et al., 1998) e imunoterapia baseada em células dendríticas.

## 1.3. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

### 1.3.1. ASPECTOS GERAIS E REGULAÇÃO DA AUTOIMUNIDADE

Existem diversas proteínas de choque térmico (hsp do inglês - heat shock protein) que se classificam em famílias de acordo com seu peso molecular. Fisiologicamente, as hsps funcionam como chaperonas, interagindo com proteínas do citoesqueleto e modulando 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 hsp é aumentada (Kaufmann et al., 1991). A hsp65, como as demais hsps, é

filogeneticamente conservada sendo largamente encontrada na natureza em organismos procarióticos e eucarióticos e ainda assim ela é altamente imunogênica (Kaufmann,1990). As hsps são moléculas-alvo em várias infecções, inclusive naquelas provocadas por patógenos intracelulares. São proteínas celulares abundantes, têm 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 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.

### 1.3.2. PARTICIPAÇÃO DA HSP60/HSP65 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 e 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).

#### 1.4. VACINAS PARA TUBERCULOSE

A tuberculose (TB), doença infecciosa que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, é responsável por cerca de 2 a 3 milhões de mortes por ano e permanece como a segunda maior causa de morte por doenças infecciosas no mundo. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que 32% da população mundial está infectada pelo bacilo *M. tuberculosis* e o Brasil ocupa o 13º lugar entre os 22 países onde se estima que ocorram 80% dos casos de tuberculose no mundo (Dye et al., 1999).

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 desta vacina na proteção contra a tuberculose é controversa. Estudos clínicos mostram que o nível de proteção varia de 0 a 75% (Fine et al., 1999) nas diferentes populações. Além desta variabilidade em termos de proteção, o BCG interfere no teste de hipersensibilidade tardia para diagnóstico da tuberculose e também é contra-indicado para indivíduos com AIDS (Britton et al., 2003). Dentro deste contexto, se procura uma nova vacina para tuberculose.

Dentre as novas formulações profiláticas em teste para tuberculose destacam-se as vacinas gênicas. Este tipo de vacina baseia-se no uso de seqüências do material genético do agente infeccioso que codifiquem antígenos imunodominantes. Estas seqüências são inseridas em vetores (plasmídeos ou vetores virais) e quando administrado, esse DNA permite a produção da proteína antigênica pelas próprias células do indivíduo vacinado sendo capaz de induzir resposta imune específica celular e humoral com memória. Além disso, as vacinas de DNA mimetizam os efeitos das vacinas vivas por possibilitarem a geração de antígenos endógenos, e conseqüentemente, a ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Também atuam como adjuvantes da resposta celular devido a presença de motivos CpG, que são seqüências específicas de DNA imunoestimulatórias (Gurunathan, 2000). O tipo de resposta imune que ocorre após a vacinação depende da via de administração: via intramuscular está associada com predominância de resposta do tipo Th1 enquanto que na via intradérmica ocorre predominância da resposta Th2. (Gurunathan, 2000)

Pesquisadores do Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT- FMRP-USP) têm avaliado vacinas alternativas para TB. Uma delas é a vacina gênica baseada no gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa de

*Mycobacterium leprae* (pcDNAhsp65 e pVAXhsp65). Camundongos BALB/c imunizados por via intramuscular, com esta vacina gênica apresentaram uma maior produção de IFN $\gamma$  em relação a 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 reativas a hsp65 nos linfonodos e produção de células de memória (Bonato et al.,1998, Silva et al.,1999). Esta vacina desencadeou resposta imune protetora na tuberculose experimental murina (Lowrie et al.,1999).

Outra alternativa vacinal investigada no CPT é a estratégia de *prime-boost*. Os protocolos de imunização do tipo *prime-boost* consistem na administração do mesmo antígeno em formulações vacinais 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 tuberculose experimental (Ferraz et al. 2004, Mollenkopf et al. 2004).

#### 1.5. 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 da 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 (Jones et al.,1993; Lamb et al.,1989). 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 mostram um efeito protetor desta preparação vacinal tanto na artrite quanto no diabetes experimental (Santos-Júnior et al., 2005; Santos-Júnior 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 na artrite adjuvante. Este é um modelo experimental bem aceito de artrite reumatóide em humanos induzido pela imunização de ratos Lewis com *Mycobacterium tuberculosis* associado ao Adjuvante Incompleto de Freund. Segundo Ragno et al. 1997, ratos Lewis imunizados por via intramuscular com uma vacina de DNA que codifica a proteína de choque térmico micobacteriana de 65 kDa (hsp65) apresentaram resistência a uma posterior indução 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- $\gamma$  e TGF- $\beta_1$  por células T estimuladas com hsp60. Quintana et al. 2003, demonstraram que uma vacina de DNA que codifica fragmentos da proteína hsp60 humana também inibe 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- $\gamma$ , quanto Th2/Th3, pela secreção de IL-10 e TGF- $\beta_1$ . Esse mesmo grupo, em 2004, 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 se mostrado capaz de suprimir quadros de autoimunidade. Um primeiro relato de que o BCG poderia ser utilizado para proteção da artrite adjuvante resultou de um estudo de van Eden et al. em 1988. Nesse estudo foram isoladas linhagens de células T artritogênicas para demonstrar que antígenos do *M. tuberculosis* contém epítopos com reatividade cruzada com auto-antígenos presentes nas cartilagens das articulações. A administração desse antígeno a ratos induziu resistência a uma posterior indução de artrite. Posteriormente, essa seqüência de aminoácidos foi caracterizada como sendo uma porção peptídica da proteína de choque térmico de 65 kDa (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 inibe 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 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 imunização com BCG bloqueia a destruição autoimune pela indução de apoptose de células T diabetogênicas através da produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e pela via Fas – Fas ligante.

A utilização do BCG na proteção contra a encefalite autoimune experimental (EAE) também vem sendo investigada. Segundo O'Connor et al. 2005, camundongos infectados com BCG apresentam uma sintomatologia clínica mais branda da EAE, se comparada aos animais não infectados com BCG. Os camundongos doentes infectados com BCG 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).

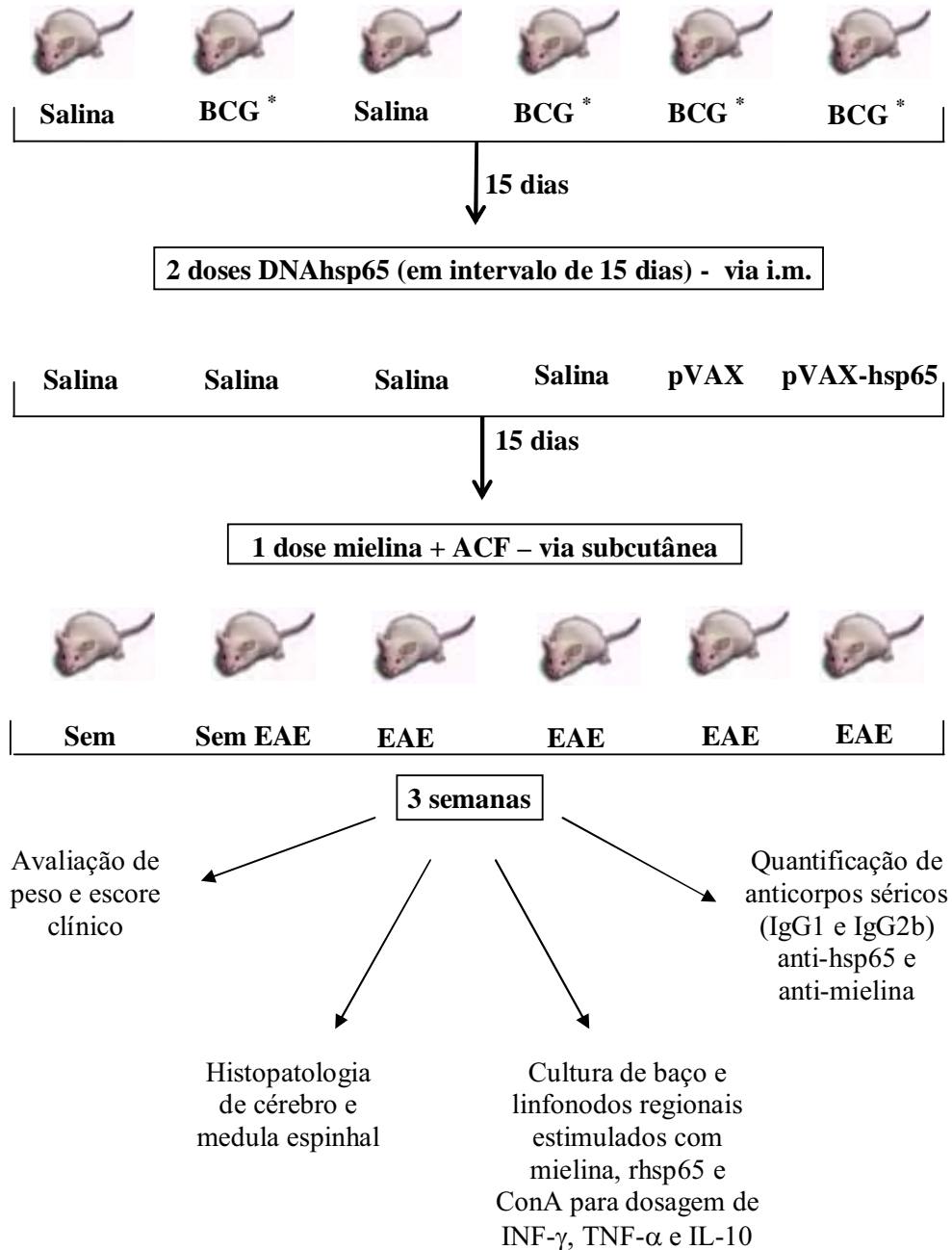
Como esclarecido na introdução acima, tanto a hsp65 quanto o BCG possuem potencial para suprimir diferentes processos autoimunes. Neste contexto, hipotetizamos que a associação do BCG com a vacina gênica DNAhsp65 seria altamente eficiente no controle de doenças autoimunes. Para testar esta hipótese avaliamos, no presente projeto, o efeito da vacinação prévia com o esquema *prime-boost* (BCG/DNA) no desenvolvimento da EAE desencadeada por inoculação de mielina em ratos Lewis.

2. OBJETIVO:

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



3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL



\* 1 dose de 0,1 ml de BCG (2-10 x 10<sup>6</sup> UFC/ml) via subcutânea

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. ANIMAIS

34 ratos Lewis fêmeas de 4 semanas de idade foram obtidos junto ao CEMIB-UNICAMP e alojados no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu onde foram mantidos em caixas plásticas de acordo com os seguintes grupos:

grupo 1 (n=5) : salina

grupo 2 (n=5): BCG (sem EAE)

grupo 3 (n=6): EAE

grupo 4 (n=6): BCG / EAE

grupo 5 (n=6): BCG / vetor / EAE

grupo 6 (n=6): BCG / vacina / EAE

Os animais foram mantidos em caixas plásticas forradas com maravalha autoclavada e expostos a um ciclo claro/escuro de 12 horas com água e ração autoclavadas *ad libitum*. A partir da indução da EAE os animais foram acompanhados diariamente, sendo verificados o peso e o escore clínico de cada um deles até o dia do sacrifício. Para evitar estressar os animais a manipulação foi a mínima necessária.

É importante ressaltar que os experimentos foram realizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu.

##### 4.2. IMUNIZAÇÃO: ESTRATÉGIA *PRIME-BOOST* BCG/DNAhsp65

A vacina utilizada como *priming* foi uma vacina BCG liofilizada, contendo bacilos vivos atenuados da cepa Moreau de *Mycobacterium bovis* (2-10 x 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônias/ml) produzida no Instituto Butantan e fornecida pela Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Como *booster* foi utilizada a vacina gênica DNAhsp65 obtida pela inserção do gene da hsp65 no plasmídeo pVAX (pVAXhsp65) e fornecida pelo Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT- FMRP-USP).

Para a imunização do grupo BCG / vacina / EAE foi administrada uma dose de 0,1 ml BCG durante a 5ª semana de vida dos animais por via subcutânea na base da cauda, seguida de *booster* na 7ª e na 9ª semana utilizando-se doses de 300 µg de pVAXhsp65 numa solução de sacarose 25% por via intramuscular na região do músculo quadríceps (direito e esquerdo). De acordo com o proposto pelo protocolo experimental já apresentado, os animais dos demais grupos ou foram só vacinados ou receberam doses equivalentes de salina, com exceção do grupo BCG / vetor / EAE que recebeu doses do plasmídeo pVAX.

#### 4.3. INDUÇÃO DA EAE

A indução da EAE foi realizada 15 dias após a última dose de vacina gênica por inoculação de uma emulsão contendo volumes iguais de uma solução 1mg/ml de proteína básica da mielina (MBP - Sigma) e de adjuvante completo de Freund (ACF – Difco), contendo *Mycobacterium butyricum* (5mg/ml). Cada animal recebeu uma injeção de 50 µl de emulsão na região do coxim plantar, contendo 25 µg de mielina.

#### 4.4. EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada em câmara de gás carbônico 19 dias após a indução da EAE quando os animais já estavam em fase de recuperação, ou seja, não apresentavam mais sinais clínicos. Após a eutanásia foi executada punção cardíaca para coleta de soro. O baço e os linfonodos poplíteo e inguinal foram removidos em condições estéreis para cultura celular, o cérebro e a medula espinhal, para análise histopatológica.

#### 4.5. CULTURA CELULAR

Para o preparo das culturas celulares os órgãos removidos foram divulsionados, as células centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI (Cultilab) acrescido de gentamicina, soro bovino fetal e L-glutamina a concentrações celulares de  $5 \times 10^6$  células/ml (baço) e  $2,5 \times 10^6$  células/ml (linfonodos), permitindo assim uma boa distribuição de células em cada poço da placa de cultura.

Para cada órgão de cada animal foram utilizados quatro poços de cultura, correspondendo aos três estímulos utilizados: hsp65 recombinante - rhsp65 (10 µg/µl), mielina (10 µg/µl) e concanavalina A – ConA (5 µg/µl) mais o controle (meio sem estímulo algum). Após incubação por 48 horas em estufa de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados para posterior dosagem de citocinas.

#### 4.6. ELISA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS

Os sobrenadantes da cultura de baço e linfonodos foram avaliados quanto à produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de rato contra cada uma das citocinas citadas (R&D Systems), diluído em tampão PBS e incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS / Tween 20 (0.05%) foi adicionado 300 µL da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas por duas horas, em temperatura ambiente, com as amostras e com as respectivas curvas de citocinas, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 1% de albumina. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos de rato biotinizados anti-citocina, durante 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, faz-se a incubação com estreptoavidina diluída 1:200 em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma), a reação foi interrompida por adição de 50 µl por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 16% e a absorbância foi determinada em leitor de ELISA a 492 nm.

#### 4.7. ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS (anti-hsp65 e anti-MBP)

Soros dos animais foram utilizados para a detecção de anticorpos específicos anti-hsp65 e anti-mielina. Placas de 96 poços foram recobertas com 100 µl/poço de uma solução contendo rhsp65 ou mielina diluída em tampão de ligação (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 17 mM, NaHCO<sub>3</sub> 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 200 µl por poço de tampão de bloqueio (PBS / Tween 20 (0,05%) mais 10% de soro fetal bovino) e então incubadas por uma hora a 37°C e lavadas novamente. As amostras de soro foram diluídas

em tampão de bloqueio nas proporções de 1/10 e 1/50 (rhsp65) e 1/1000 1/5000 (mielina), plaqueadas e incubadas a 4°C, por uma noite. As placas foram novamente lavadas e incubadas por mais uma noite, a 4°C com 100 µl por poço de anticorpo biotilado anti-IgG1 ou anti-IgG2b de rato (Oxford Biotechnology) diluído em tampão de bloqueio. Após incubação seguida de lavagem das placas, as mesmas foram incubadas com 100 µl por poço de complexo estreptavidina-peroxidase (StrepAB - Dako Corporation) diluído em tampão bloqueio, sob o abrigo da luz, por 30 minutos, a temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi revelada com 100 µl por poço de solução de OPD (Sigma) e interrompida com a adição de 50 µl por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 16%. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA a 492nm.

#### 4.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Para análise histopatológica foram coletados cérebro e medula espinhal, a qual foi separada em suas porções cervical, torácica e lombar. Assim que removidos do animal os órgãos foram conservados em formol tamponado a 10% por um período de 24 horas e depois lavados em água corrente até remoção dos vestígios de formol sendo então mantidos em álcool 70% até a preparação dos blocos.

Para o emblocamento, o órgão, ou parte dele, foi alocado em cassetes plásticos que passam por uma bateria de gradientes de álcool e de xilol assim como por banhos de paraplast (uma resina semelhante à parafina) em estufa, após os quais o órgão é removido do cassete e colocado numa forma que é preenchida por paraplast formando-se um bloco a temperatura ambiente. A partir do bloco foram obtidos cortes de 5 µm montados em lâminas e corados por hematoxilina-eosina (H.E.)

#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média +- desvio padrão 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 interquartilício e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%.

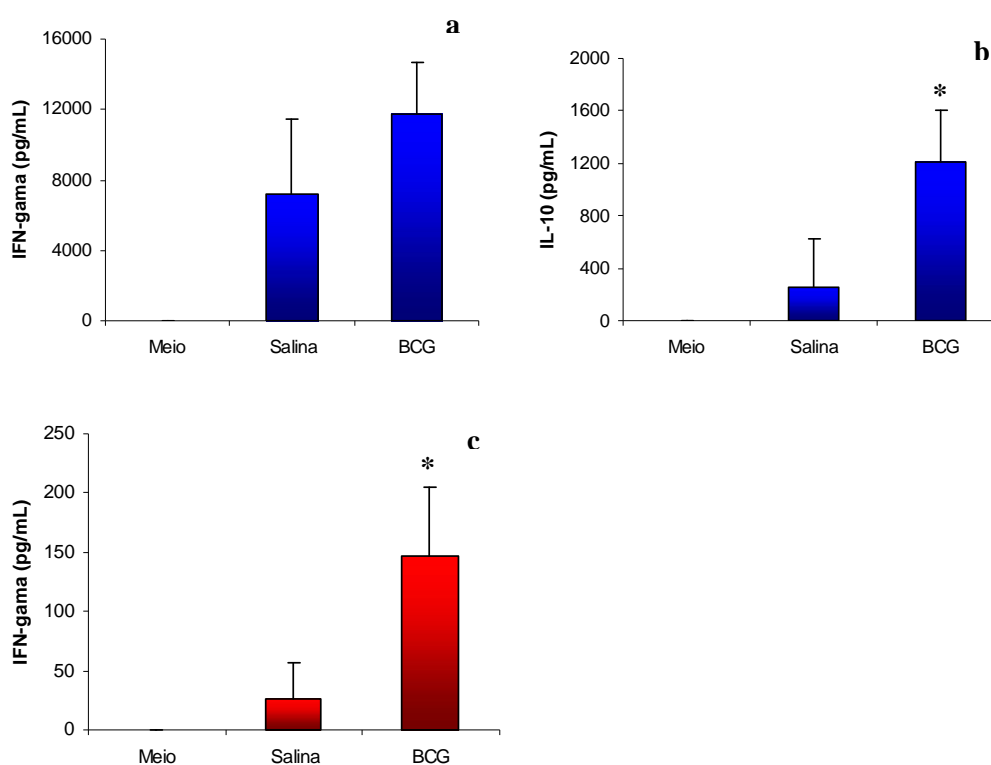
Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows version 2.0 1995, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA.

A representação gráfica dos resultados foi feita utilizando-se o software Microsoft Office Excel versão 11 (2003) para resultados em média e em mediana. (Hunt, 2008)

## 5. RESULTADOS

## 5.1. IMUNOGENICIDADE DO BCG

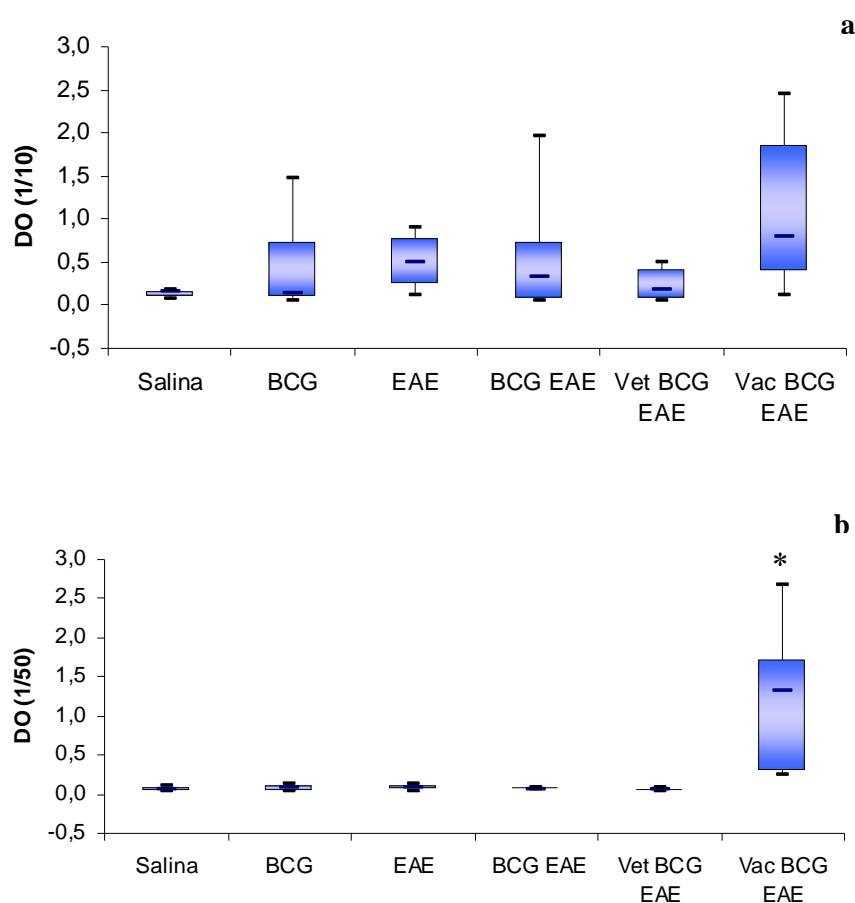
A avaliação da produção de citocinas por células de animais imunizados com BCG indica que este procedimento determinou alterações condizentes com ativação imunológica. Células esplênicas dos animais imunizados produziram maior quantidade de IFN- $\gamma$  quando estimuladas *in vitro* com ConA (figura 1a) ou com rhsp65 (figura 1c), sendo que neste último caso o aumento foi significativo. Células oriundas de linfonodos de animais imunizados também produziram níveis significativamente mais elevados de IL-10 comparativamente aos animais do grupo controle, ou seja, injetados com salina (figura 1b).



**Figura 1:** Efeito da imunização com BCG na produção das citocinas: IFN- $\gamma$  (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  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0.05$  em comparação com o grupo salina.

## 5.2. IMUNOGENICIDADE DA DNAhsp65

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 / vacina / EAE, esta diferença não foi estatisticamente significativa (figura 2a). Por outro lado, anticorpos IgG2b anti-hsp65 estavam presentes somente no grupo BCG / vacina / EAE, atestando a imunogenicidade da vacina gênica utilizada (figura 2b).

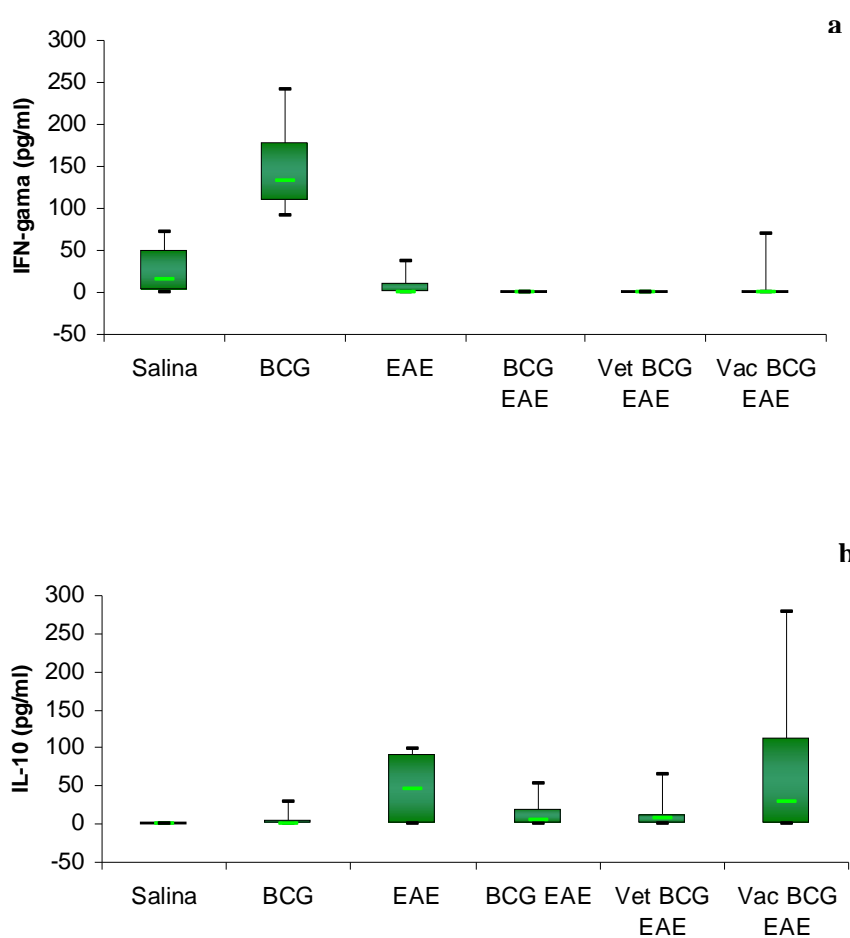


**Figura 2:** Produção de anticorpos IgG1 (a) e IgG2b (b) anti-hsp65 em ratos Lewis imunizados com BCG e pVAXhsp65. As dosagens foram feitas por ELISA em amostras de soro diluídas 1/10. Os resultados representam a mediana (25% - 75%) de 5 a 6 animais por grupo. \*  $p < 0.05$  em comparação com os demais grupos.



Nos animais inoculados com a estratégia BCG/DNAhsp65, os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos por células esplênicas estimuladas com rhsp65, contrariamente ao esperado, foram similares aos observados no grupo controle EAE (figura 3a).

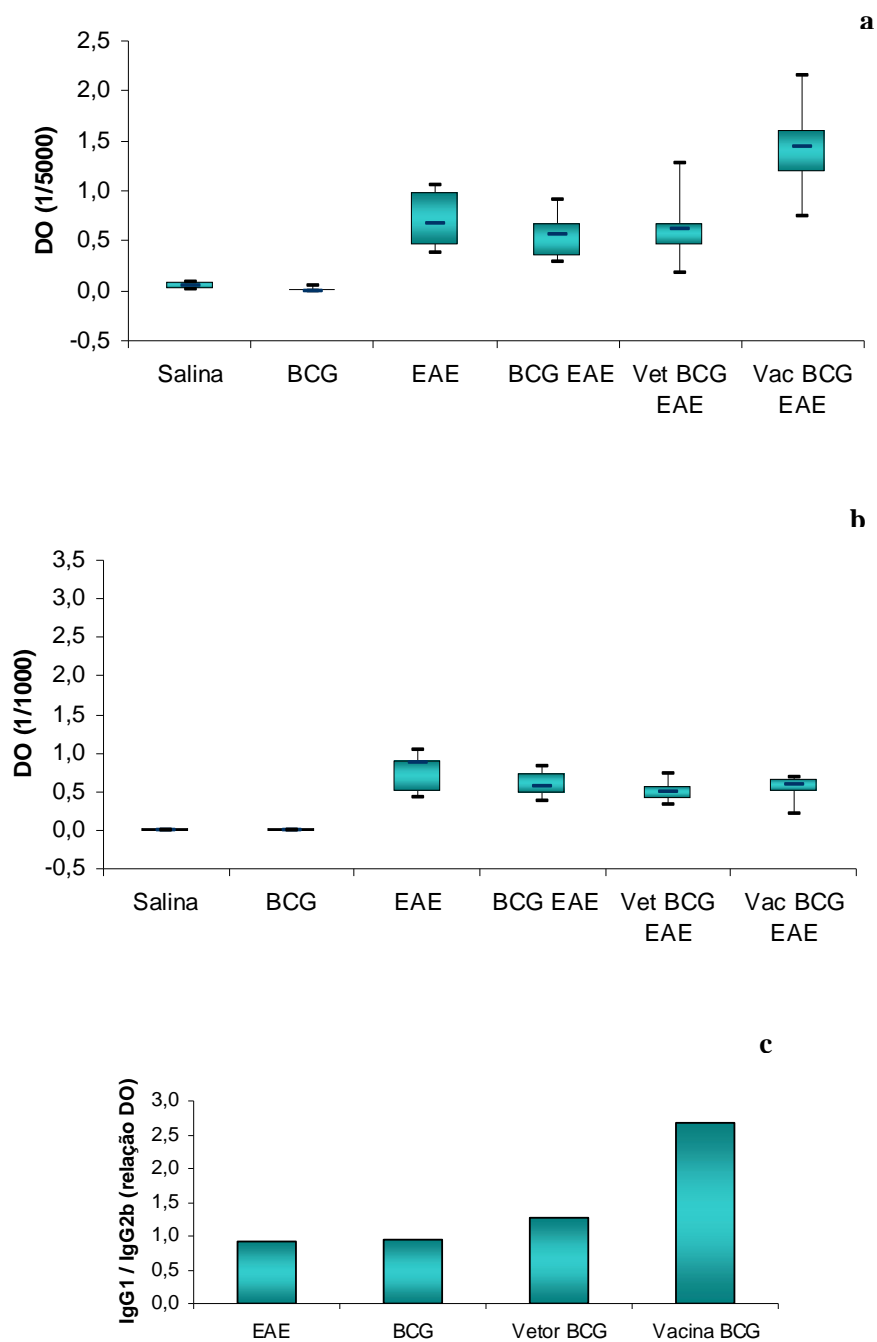
Por razões metodológicas, a detecção de IL-10 só foi possível em culturas de células de linfonodos; neste caso o estímulo com rhsp65 determinou níveis mais elevados, embora sem diferença estatística, no grupo BCG / vacina / EAE em relação aos demais (figura 3b).



**Figura 3:** Produção de IFN- $\gamma$  (a) e IL-10 (b) em ratos Lewis imunizados com BCG e pVAXhsp65. Células esplênicas (a) e células de linfonodo (b) foram estimuladas *in vitro* com rhsp65. Os resultados representam a mediana (25% - 75%) de 5 a 6 animais por grupo. \*  $p < 0.05$  em comparação com os demais grupos.

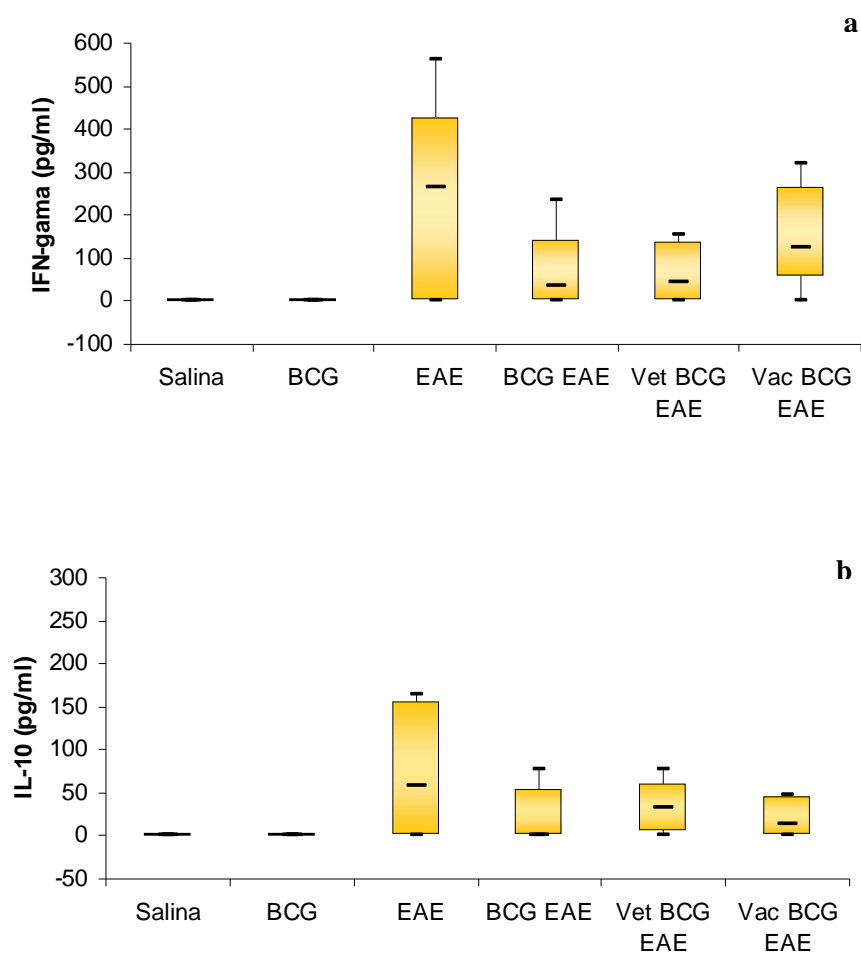
### 5.3. EFEITO DA ESTRATÉGIA BCG/DNAhsp65 NA RESPOSTA IMUNE ANTI-MIELINA

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- $\gamma$  pelo baço e IL-10 pelos linfonodos após estímulo *in vitro* com proteína básica de mielina (MBP). A inoculação prévia de DNAhsp65, mas não a de BCG, determinou aumento, embora não significativo, nos níveis de IgG1 anti-mielina (figura 4a). Tanto o BCG quanto a DNAhsp65 diminuíram de forma discreta, não significativa, os níveis de IgG2b anti-mielina (figura 4b). Para facilitar o entendimento deste efeito, a relação entre os níveis de IgG1 e IgG2b nos diferentes grupos, é mostrada na figura 4c, indicando que só a imunização com DNAhsp65 foi capaz de aumentar os níveis de IgG1.



**Figura 4:** Efeito da imunização prévia com BCG e pVAXhsp65 na produção de anticorpos anti-mielina. Foram utilizadas amostras de soro diluídas 1/5000 e 1/1000 para a análise de IgG1 (a) e IgG2b (b), respectivamente. Os resultados representam a mediana (25% - 75%) de 5-6 animais por grupo. A relação IgG1 / IgG2b é representada na figura 4c pela média do grupo. \*  $p < 0.05$  em comparação com os demais grupos.

A inoculação prévia com BCG modulou de forma similar a produção de IFN- $\gamma$  pelo baço e a produção de IL-10 pelos linfonodos (figuras 5a e 5b, 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.

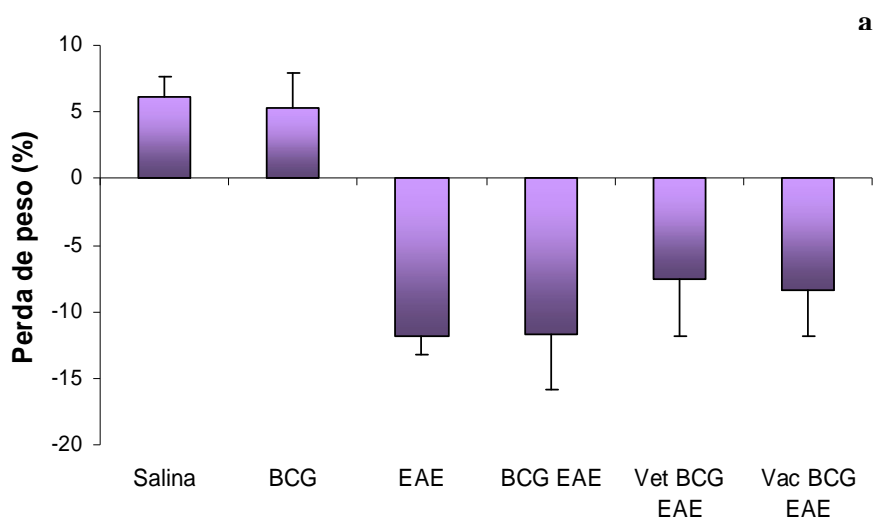


**Figura 5:** Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 na produção de IFN- $\gamma$  (a) e IL-10 (b) em ratos Lewis submetidos à indução de EAE. Células esplênicas (a) e células de linfonodo (b) estimuladas *in vitro* com mielina. Os resultados representam a mediana (25% - 75%) de 5-6 animais por grupo. \*  $p < 0.05$  em comparação com os grupos com EAE.

#### 5.4. EFEITO DA ESTRATÉGIA BCG/DNAhsp65 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA EAE

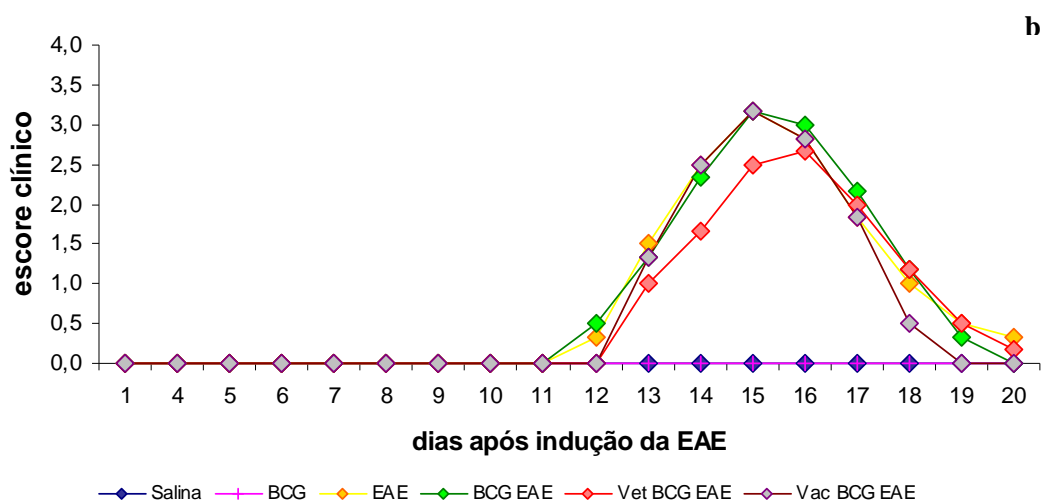
O desenvolvimento da EAE foi acompanhado através de três parâmetros distintos: perda de peso, escore clínico e intensidade do processo inflamatório no SNC (cérebro e diferentes regiões da medula espinhal: cervical, torácica e lombar).

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 6a). 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 vetor/BCG ou vacina/BCG (7 a 8%), a mesma não diferiu estatisticamente dos grupos salina e salina/BCG.



**Figura 6a:** Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 na evolução do peso corpóreo de ratos Lewis submetidos à indução de EAE. Os resultados representam a média da porcentagem de perda de peso de 5 a 6 animais por grupo  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0.05$  em comparação com os demais grupos.

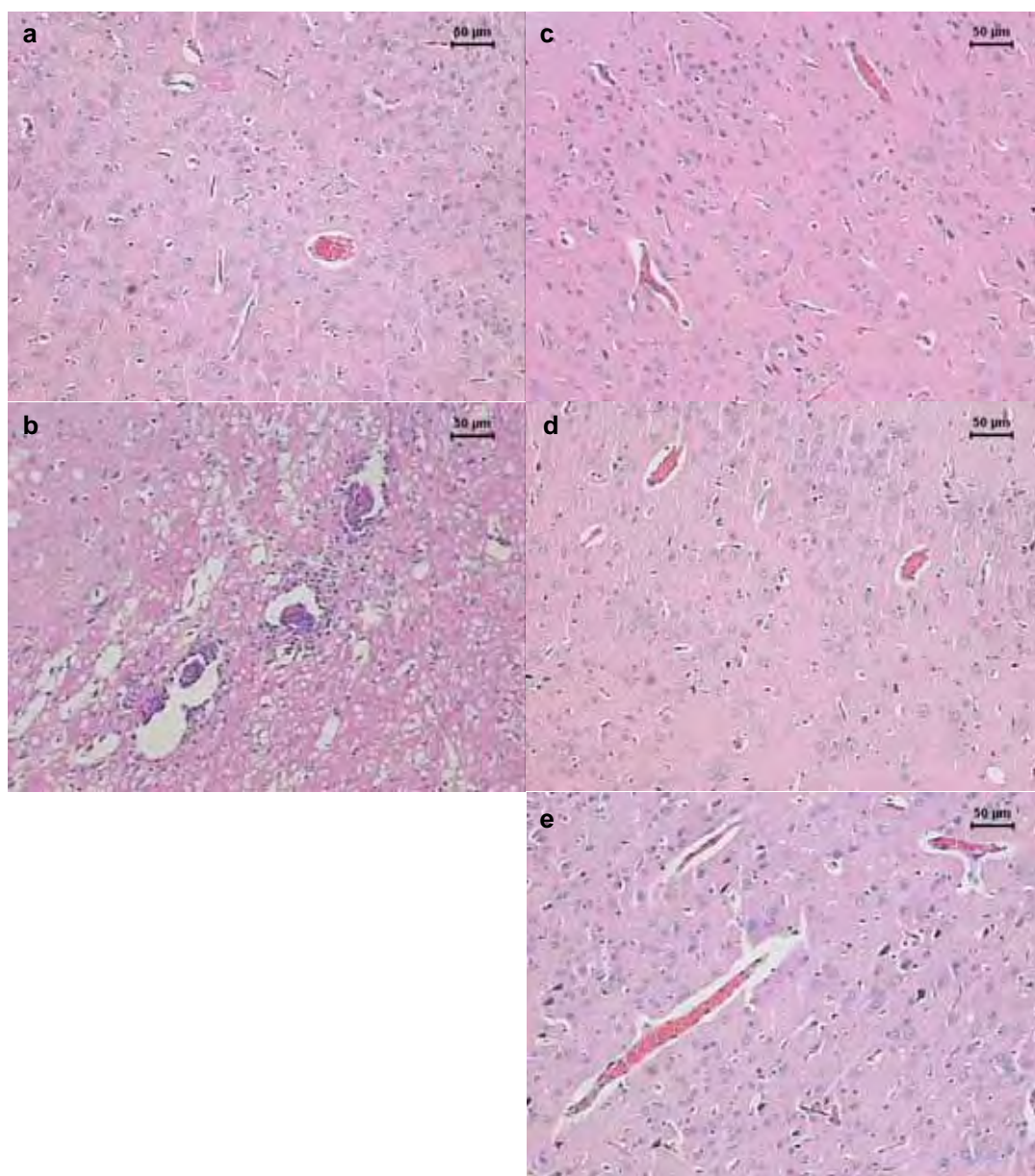
Em relação ao escore clínico, não foram observadas diferenças importantes entre os grupos. Os sintomas clínicos foram observados a partir dos dias 9 ou 10 após a inoculação de mielina. O escore máximo foi similar e a fase de recuperação também ocorreu em período similar nos diferentes grupos (figura 6b).



**Figura 6b:** Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 na evolução do escore clínico de ratos Lewis submetidos à indução de EAE. Os resultados representam a média do escore clínico de 5 a 6 animais por grupo.

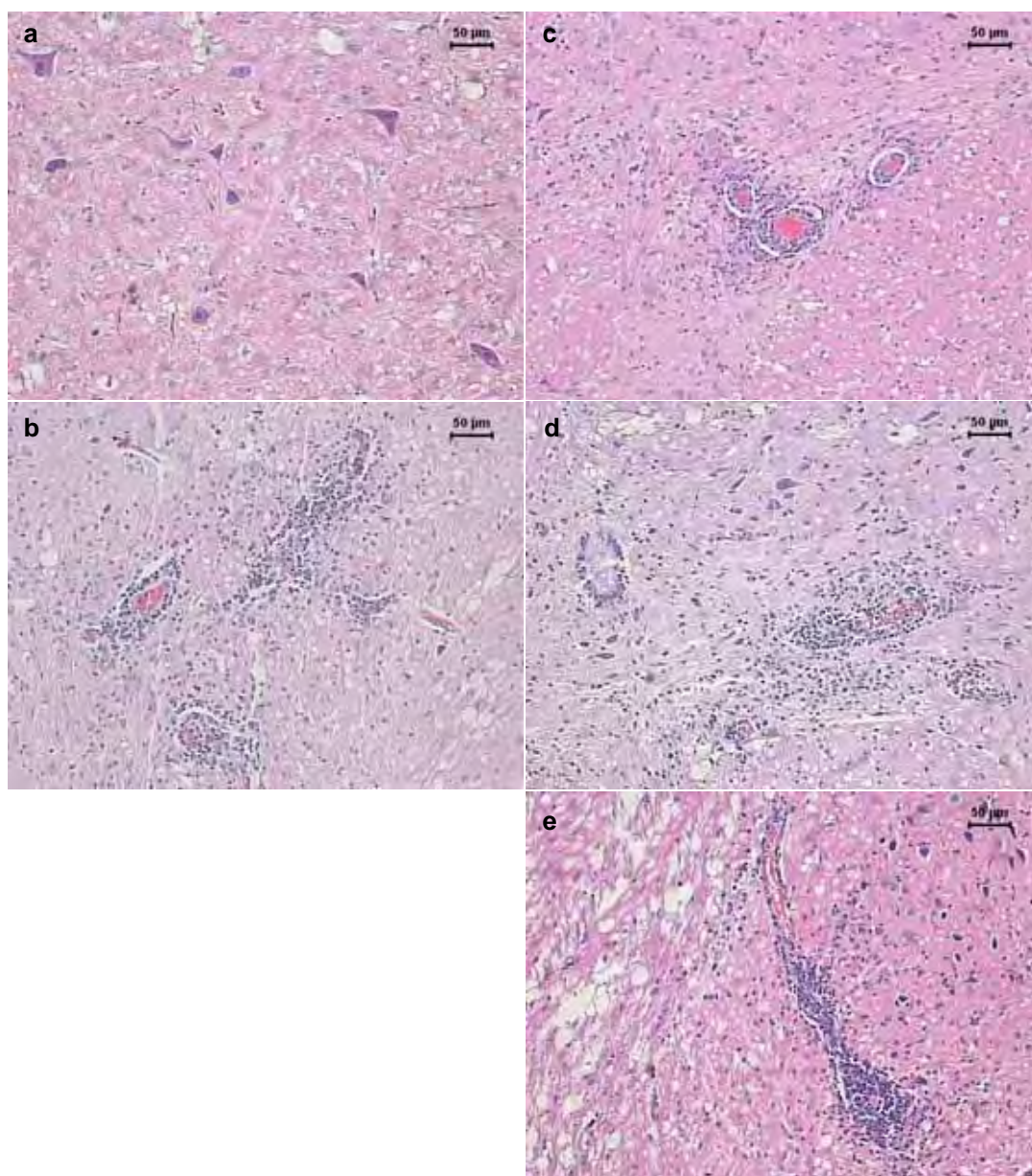
Na figura 7 são mostrados os cortes de cérebro. Como pode se observar, os dois grupos controles apresentam padrão histológico condizente, ou seja, ausência de inflamação no grupo salina (figura 7a) e presença de processo inflamatório típico, caracterizado pela predominância de células mononucleares no espaço perivascular no grupo EAE, respectivamente (figura 7b). Este mesmo padrão foi, como esperado, constatado nos controles dos cortes de medula cervical (figuras 8a e 8b), torácica (figuras 9a e 9b) e lombar (figuras 10a e 10b).

O efeito da imunização prévia com BCG ou BCG/DNAhsp65 foi distinto dependendo da área do SNC que foi analisada. No cérebro foi observada redução acentuada do processo inflamatório nos grupos BCG / EAE, BCG / vetor / EAE e BCG / vacina / EAE figuras 7c, 7d e 7e respectivamente. Nos casos das medulas cervical (figuras 8c, 8d e 8e) e torácica (figuras 9c, 9d e 9e) o processo inflamatório foi pronunciado e foi, aparentemente, similar ao observado no grupo controle correspondente (EAE). Na região lombar da medula ocorreu menor inflamação nos grupo BCG / EAE (figura 10c) e BCG / vacina / EAE (figura 10e). No grupo BCG / vetor / EAE, esta redução da inflamação não foi observada (figura 10d).

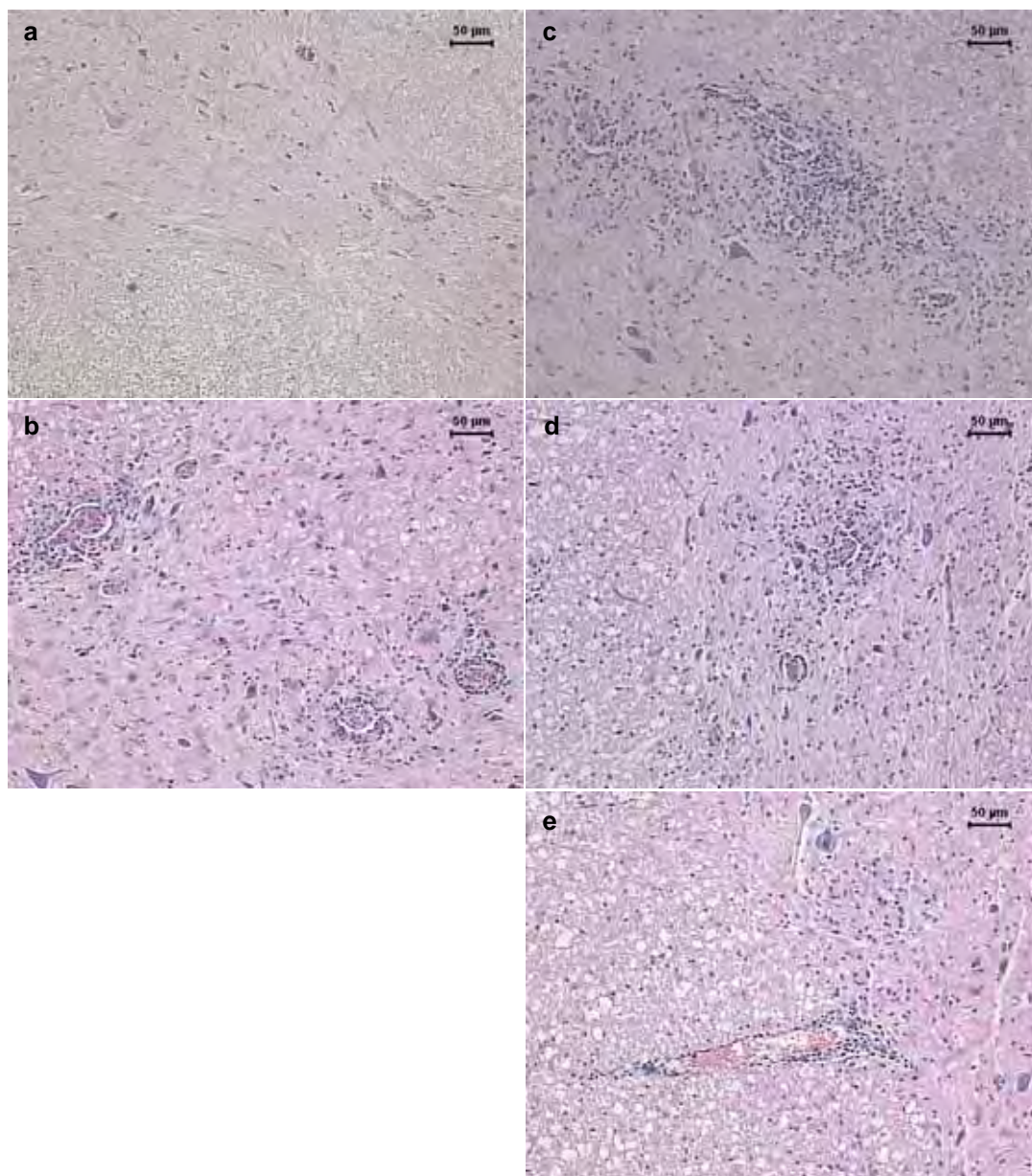


**Figura 7:** Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 no processo inflamatório no cérebro de animais com EAE. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório no cérebro de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo BCG / EAE (c), do grupo BCG / vetor / EAE (d) e do grupo BCG / vacina / EAE (e). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).

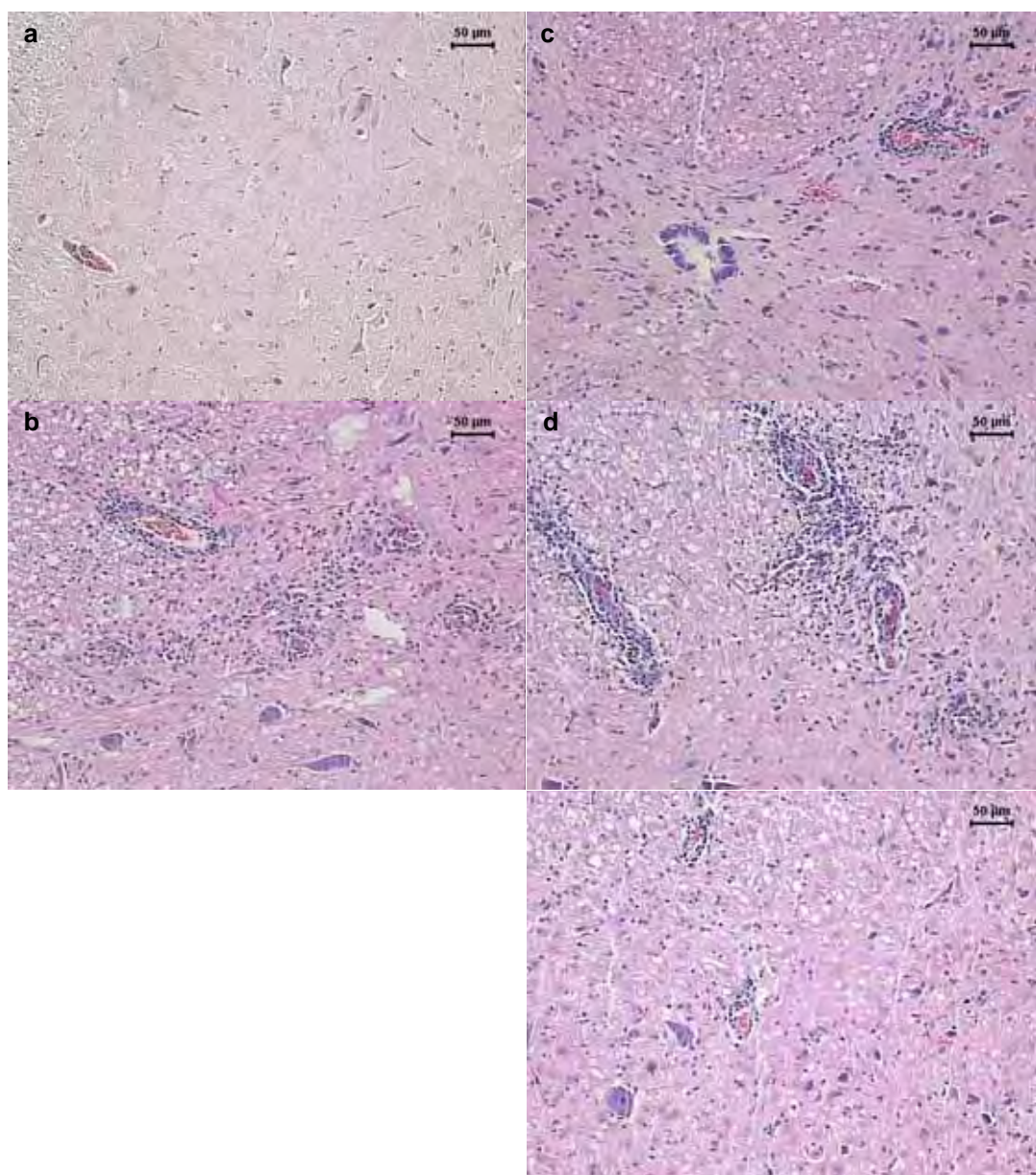




**Figura 8:** Efeito da estratégia BCG / DNAhsp65 no processo inflamatório na porção cervical da medula espinhal de animais com EAE. Avaliação da presença de infiltrado inflamatório na medula cervical de animais normais (a), animais com EAE (b), animais do grupo BCG / EAE (c), do grupo BCG / vetor / EAE (d) e do grupo BCG / vacina / EAE (e). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).



**Figura 9:** 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 / vetor / EAE (d) e do grupo BCG / vacina / EAE (e). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E).



**Figura 10:** 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 / vetor / EAE (d) e do grupo BCG / vacina / EAE (e). Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina / eosina (H&E)

## 6. DISCUSSÃO

Neste 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 para tuberculose 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- $\gamma$  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 revela 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 em outro protocolo desenvolvido em nosso laboratório, os quais indicaram 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 (Tree et al., 2004; Horwitz et al., 2006). A grande variabilidade dos resultados referentes aos níveis de IFN- $\gamma$  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/vacina/EAE, 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- $\gamma$  e IL-10 caracterizado por uma diminuição destes níveis nos grupos BCG/EAE, BCG/vetor/EAE e BCG/vacina/EAE, em comparação com o grupo controle salina (EAE), ou seja, não imunizado previamente. Em função dos mecanismos imunopatogênicos envolvidos na EM e na EAE, poderíamos hipotetizar que no caso dos animais previamente vacinados com BCG ou DNAhsp65, esta menor produção de IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> reativas para MOG 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 tuberculose este resultado é, 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.

A imunização prévia com BCG, BCG/vetor e BCG/DNAhsp65 diminuiu de forma evidente a inflamação perivascular no cérebro. O tipo de análise utilizada, que consistiu em uma inspeção visual, não permitiu uma comparação quantitativa entre os diferentes grupos.

Os resultados obtidos com este protocolo experimental são considerados bastante promissores em relação a esta vacina gênica para a tuberculose, visto que sugerem que a vacinação com essa construção gênica, associada ao BCG, não desencadeará ou agravará os quadros de 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 gênica sozinha 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<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, influxo de células CD25<sup>+</sup> 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 deste esquema *prime-boost* na tuberculose, estes resultados também estimulam propostas de investigação de um possível efeito protetor desta estratégia na artrite e no diabetes.

## 7. CONCLUSÃO

A estratégia *prime-boost* (BCG/DNAhsp65) não determinou efeito deletério (aceleração ou agravamento) na EAE. Ao contrário, este esquema determinou efeito parcialmente protetor na EAE, impedindo o processo inflamatório no cérebro.

## 8. REFERÊNCIAS \*

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Birnbaum G, Kotilinek L. Immunity to heat shock proteins and neurological disorders of women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1999;7:39-48.
7. 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.
8. Britton WJ, Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2003;81:34-45.
9. 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 Technol Med Sci*. 2004;24:107-11.

\* 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 updated 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). National Library of Medicine. List of Journal indexed in Index Medicus. Washington; 2003. 240p.



10. 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.
11. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global Burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global surveillance and Monitoring Project. *JAMA*. 1999;282:677-86.
12. 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.
13. Fine PEM, Carneiro AM, Milstein IB, Clements, JC. Issues relating to the use of BCG immunization programmes. Geneva: WHO Global surveillance and Monitoring Project; 1999.
14. 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.
15. 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.
16. Gurunathan S, Slinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application and optimization. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:927-74.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Hunt N. Boxplots in Excel [cited in 2008 Aug 4]. Available from: <http://www.coventry.ac.uk/ec/~nhunt/boxplot.htm>
21. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther*. 2005;106:163-77.

22. Jones DB, Coulson AF, Duff GW. Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. *Immunol Today*. 1993;14:115-8.
23. Kaufmann SH. Heat shock proteins and immune response. *Immunol Today*. 1990;11:129-36.
24. 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.
25. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001;1:20-30.
26. 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.
27. Link H, Xiao B. Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol Rev*. 2001;184:117-28.
28. 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.
29. Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*. 1997;15:834-8.
30. 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.
31. 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.
32. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8:913-9.
33. 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.
34. 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.

35. 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.
36. O'Connor RA, Wittmer S, Dalton DK. Infection-induced apoptosis deletes bystander CD4+ T cells: a mechanism for suppression of autoimmunity during BCG infection. *J Autoimmun.* 2005;24:93-100.
37. Orme IM. Tuberculosis vaccines: current progress. *Drugs.* 2005;65:2437-44.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Raine CS. The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol.* 1994;36:61-72.
46. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy.* 2006;36:1357-66.
47. 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.

48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. World Health Organization. Atlas: country resources for neurological disorders. Geneva: WHO; 2004 [cited 2008/09/05].  
Available from: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/neurogy\\_atlas\\_lr.pdf](http://www.who.int/mental_health/neurology/neurogy_atlas_lr.pdf).
56. 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.