



*Juliana Seger*

*Efeito da vacina gênica  
para tuberculose (pVAXhsp65)  
na Encefalite Autoimune  
Experimental*

*Botucatu*

*2007*

**Juliana Seger**

**Efeito da vacina gênica para tuberculose (pVAXhsp65) na  
Encefalite Autoimune Experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Doenças Tropicais da  
Faculdade de Medicina de Botucatu, para  
a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Botucatu

2007

*Dedico este trabalho:*

*Aos meus pais, Pedro e Zeneida,  
que mesmo morando longe de mim sempre  
estiveram presentes no meu coração e mente.  
Pelo exemplo de ser humano, apoio  
(principalmente nos momentos difíceis) e  
possibilidade de concretização de mais este sonho.*

*A minha orientadora Profa. Dra. Alexandrina  
Sartori pelos ensinamentos, dedicação e exemplo  
de coragem e dinamismo que contribuíram de  
forma imensurável  
para o meu crescimento profissional.*

## *AGRADECIMENTOS*

- ✓ *Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ela nada seria possível.*
- ✓ *Ao meu noivo Gustavo Bloise Pieroni pela compreensão, conselhos, conforto emocional e momentos felizes proporcionados.*
- ✓ *As agências de fomento em pesquisa: CAPES pela bolsa de estudos concedida, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.*
- ✓ *Ao CPT e a Rede TB, pelos auxílios concedidos por tornar este trabalho com a vacina gênica viável.*
- ✓ *Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia e aos professores do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem.*
- ✓ *A Profa. Dra. Ângela Campos Soares e Dra. Jussara Marcondes Machado pelos valiosos conselhos durante meu exame de qualificação.*
- ✓ *Aos colegas de laboratório Douglas, Thaís, Ana Cláudia, Larissa, Lucélia e Sofia pelos momentos compartilhados, pelos auxílios, pelos momentos de descontração e conversas.*
- ✓ *A minha colega de laboratório e amiga Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella pelo companheirismo, pela paciência, pelos conhecimentos compartilhados, pelas dificuldades superadas, pelos momentos alegres e pelo conforto nos momentos tristes. É muito difícil trabalhar sem você!*

- ✓ *A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, especialmente Luiz e Lulinha, pelos inúmeros auxílios, disposição em ajudar, amizade e paciência.*
- ✓ *As secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem: Solange, Nice e Sônia pelo carinho, prontidão, dedicação, conversas e amizade. Muito obrigada por tudo!*
- ✓ *Aos meus colegas de Pós-graduação.*
- ✓ *Aos funcionários da seção de Pós-Graduação.*
- ✓ *Ao amigo Zé Buça pelo “socorro” na formatação do trabalho.*

## **Sonhe**

Sonhe com aquilo que você quiser

Seja o que você quer ser

Porque você possui apenas uma vida

E nela só se tem uma chance de fazer aquilo que quer

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce

Dificuldades para fazê-la forte

E esperança suficiente para fazê-la feliz

As pessoas felizes não têm as melhores coisas

Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos

A felicidade aparece para aqueles que choram

Para aqueles que se machucam

Para aqueles que buscam e tentam sempre

E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

(Clarice Lispector)

## RESUMO

A necessidade de uma vacina mais segura e eficaz para a profilaxia da tuberculose (TB) é consenso na comunidade científica. A vacina gênica contendo o gene da proteína de choque térmico de 65 KDa (hsp65) do *Mycobacterium leprae*, e denominada pVAXhsp65, vem sendo investigada no Brasil. Esta vacina induz imunidade protetora contra a TB experimental em camundongos e cobaias. Como o gene desta vacina codifica uma proteína altamente conservada, existe a preocupação de que a mesma induza autoimunidade. O objetivo deste trabalho foi, portanto, investigar se esta vacina modula o desenvolvimento da encefalite autoimune experimental (EAE), que é um modelo para estudo de Esclerose Múltipla. Esta investigação foi feita em três etapas: padronização da EAE em ratos Lewis, caracterização da resposta imune induzida pela vacina pVAXhsp65 nestes animais e, finalmente, avaliação do efeito desta vacina nas características clínicas e imunológicas da EAE induzida nestes animais. Ratos Lewis fêmeas imunizados no coxim plantar com 50 µg de mielina, associada ao Adjuvante Completo de Freund, desenvolveram doença típica, caracterizada por perda acentuada de peso, escore clínico elevado e alta produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A imunização dos animais com 3 doses de pVAXhsp65 por via intramuscular não desencadeou resposta imune humoral, entretanto, induziu resposta imune celular, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$  por células esplênicas. Animais previamente vacinados desenvolveram EAE com características clínicas e imunológicas similares às observadas em animais não vacinados. Portanto, este trabalho permitiu padronizar de forma satisfatória a EAE em ratos Lewis o que permitirá a utilização deste modelo em futuras investigações. Além disso, constatamos que a imunização destes animais com DNAhsp65 não alterou o desenvolvimento típico da EAE, ou seja, esta doença não se manifestou de forma mais grave ou branda.

**Palavras-chave:** vacina gênica, tuberculose, hsp65, esclerose múltipla, encefalite autoimune experimental (EAE).

## ABSTRACT

The development of an effective tuberculosis (TB) vaccine is an urgent priority. A genetic vaccine containing the heat shock protein (hsp65) gene from *Mycobacterium leprae* (pVAXhsp65) showed prophylactic and therapeutic activity in experimental TB. As anti-hsp65 immune response is present in both, multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), it is important to evaluate if pVAXhsp65 immunization affects EAE development. To test this possibility we first optimized EAE development in female Lewis rats. The best procedure included immunization in the footpad with 50 µg of myelin associated with Complete Freund Adjuvant. This triggered a typical disease, characterized by significant weight loss, high clinical scores and elevated IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production. Immunization with pVAXhsp65 induced immune response characterized by absence of anti-hsp65 antibodies but significant IFN- $\gamma$  production by splenic cells stimulated with recombinant rhsp65. Animals previously immunized with pVAXhsp65 developed an EAE with weight loss, clinical score and immune response very similar to non-immunized rats. This investigation allowed the optimization of a very promising model of multiple sclerosis that will benefit other research projects in our laboratory. In addition, these results showed that immunization of Lewis rats with pVAXhsp65 did not exacerbate or delay EAE development.

**Key word:** genetic vaccine, hsp65, tuberculosis, multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 : | Escore clínico em ratos Lewis da colônia Botucatu, submetidos à indução de EAE por imunização no dorso com 100 µl de emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF. Os escores clínicos foram avaliados diariamente. Resultados representam os escores clínicos individuais dos 4 animais imunizados. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.....  | 37 |
| Figura 2 : | Escore clínico em ratos Lewis da colônia Botucatu, submetidos à indução de EAE por imunização no coxim plantar com 50 µl da emulsão (mielina 25 µg) associada ao ACF. O escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados representam os escores clínicos individuais dos 4 animais imunizados. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização..... | 38 |
| Figura 3 : | Escore clínico em ratos Lewis da colônia Botucatu, submetidos à indução de EAE por imunização no coxim plantar com 100 µl emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF. O escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados representam os escores clínicos individuais dos 3 animais imunizados. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.....   | 39 |
| Figura 4:  | Escore clínico em ratos Lewis da colônia CEMIB, submetidos à indução de EAE por imunização no dorso com 100 µl da emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF. O escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados representam os escores clínicos individuais dos 3 animais. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.....                      | 42 |
| Figura 5 : | Escore clínico em ratos Lewis da colônia CEMIB, submetidos à indução de EAE por imunização no coxim plantar com 50 µl da emulsão (mielina 25 µg) associada ao ACF. O escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados apresentam escores clínicos individuais de 3 animais Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.....                     | 43 |
| Figura 6 : | Escore clínico em ratos Lewis da colônia CEMIB, submetidos à indução de EAE por imunização no coxim plantar com 100 µl da emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF e o escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados apresentam escore clínico individual dos 3 animais. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.....                    | 44 |
| Figura 7 : | Evolução do peso corpóreo de ratos Lewis submetidos ao processo de indução de EAE por imunização no coxim plantar com 100 µl da emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF. Os pesos individuais dos 6 animais foram avaliados diariamente. a) Pesos individuais (somente um controle foi incluído para                                                                 |    |

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|             | facilitar a visualização). b) Peso médio $\pm$ desvio médio.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 47 |
| Figura 8 :  | Escore clínico em ratos Lewis submetidos ao processo de indução de EAE por imunização no coxim plantar com 100 $\mu$ l da emulsão (mielina 50 $\mu$ g) associada ao ACF. Os escores clínicos de 6 animais foram avaliados diariamente. a) Escore individual dos animais (somente um controle foi incluído para facilitar a visualização). b) Escore médio $\pm$ desvio médio.....                                                                                                     | 48 |
| Figura 9 :  | Nível de anticorpos séricos anti-mielina em ratos Lewis submetidos à indução de EAE por imunização com mielina (50 $\mu$ g) associada com ACF. Os níveis de anticorpos foram avaliados em amostras de soro obtidas nas fases aguda (15º dia) e de recuperação (20º dia). As dosagens foram feitas por ELISA em amostras de soro diluídas 1:1000. Os resultados representam a média de 3 animais por grupo $\pm$ desvio médio.....                                                     | 49 |
| Figura 10 : | Produção de IFN- $\gamma$ (pg/mL) por células esplênicas de ratos Lewis com EAE. Células esplênicas foram obtidas nas fases aguda (15º dia) e de recuperação (20º dia) da doença e estimuladas com mielina 10 $\mu$ g/mL de cultura (a) ou (b) estimuladas com ConA 5 $\mu$ g/mL de cultura (b). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e os níveis de IFN- $\gamma$ determinados por ELISA. Os resultados representam a média de 3 animais por grupo $\pm$ desvio médio..... | 51 |
| Figura 11 : | Produção de TNF- $\alpha$ (pg/mL) por células esplênicas de ratos Lewis com EAE. Células esplênicas foram obtidas nas fases aguda (15º dia) e de recuperação (20º dia) da doença e estimuladas com mielina 10 $\mu$ g/mL de cultura (a) ou com ConA 5 $\mu$ g/mL de cultura (b). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e os níveis de TNF- $\alpha$ determinados por ELISA. Os resultados representam a média de 3 animais por grupo $\pm$ desvio médio.....                 | 51 |
| Figura 12 : | Produção de anticorpos IgG1 (a) e IgG2b (b) em ratos Lewis imunizados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias / 100 $\mu$ g cada / via i.m.). As amostras de soro foram coletadas duas semanas após a última dose da vacina e testadas após diluição 1/10. Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio médio de 4 animais.....                                                                                                                                      | 53 |
| Figura 13 : | Produção de IFN- $\gamma$ por células esplênicas de ratos Lewis imunizados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias / 100 $\mu$ g cada / via i.m.) Células esplênicas foram obtidas 15 dias após a última dose da vacina e as culturas estimuladas com rhsp65 (a) e ConA (b). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e a concentração de IFN- $\gamma$ foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como a                                                   |    |

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|             | média ± desvio médio de 8<br>animais.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 54 |
| Figura 14:  | Efeito da vacinação prévia com pVAXhsp65 no peso dos animais submetidos à indução de EAE. Os animais foram inoculados com vacina, vetor ou salina e submetidos à indução de EAE. O peso individual foi avaliado diariamente. a) Pesos individuais (somente um controle foi incluído para facilitar a visualização). b) Peso médio ± desvio médio. Resultados referem a grupos com 4 animais.....                                                                                                | 57 |
| Figura 15 : | Efeito da vacinação prévia com pVAXhsp65 no escore clínico dos animais submetidos à indução de EAE. Os animais foram inoculados com vacina, vetor ou salina e submetidos a indução de EAE. O escore clínico foi avaliado diariamente. a) Escore individual dos animais (somente um controle foi incluído para facilitar a visualização). b) Escore médio ± desvio médio. Resultados referem-se a grupos experimentais com 4 animais.....                                                        | 58 |
| Figura 16 : | Efeito da imunização com pVAXhsp65 no nível de anticorpos anti-mielina. Ratos Lewis foram imunizados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias) e posteriormente submetidos a indução de EAE. Os níveis de anticorpos anti-mielina foram determinados por ELISA em amostras de soro diluídas 1/1000. a) IgG1 e b) IgG2b. Os resultados representam a média de 4 animais por grupo ± desvio médio.....                                                                                     | 59 |
| Figura 17 : | Efeito da imunização prévia com pVAXhsp65 na produção de IFN- $\gamma$ . Ratos Lewis foram inoculados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias / 100 $\mu$ g cada / via i.m.), vetor ou salina e 15 dias após a última dose foi desencadeada a EAE. A produção de IFN- $\gamma$ foi testada no sobrenadante de células esplênicas obtidas na fase de recuperação e estimuladas com mileina (a) ou ConA (b). Os resultados representam a média de 4 animais por grupo.....                | 61 |
| Figura 18 : | Efeito da imunização prévia com pVAXhsp65 na produção de TNF- $\alpha$ . Ratos Lewis foram inoculados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias / 100 $\mu$ g cada / via i.m.), vetor ou salina e 15 dias após a última dose foi desencadeada a EAE. A produção de TNF- $\alpha$ foi testada no sobrenadante de células esplênicas obtidas na fase de recuperação e estimuladas com mileina (a) ou ConA (b). Os resultados representam a média de 4 animais por grupo ± desvio médio..... | 62 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrometro

AB: conjugado estreptoavidina-peroxidase

ACF: Adjuvante Completo de Freund

Ag: antígeno

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANOVA: análise de variância

APC: célula apresentadora de antígeno

BCG: Bacilo de Calmette Guérin

BSA: albumina bovina

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

ConA: concanavalina A

CpG: citosina – fosfato – guanina

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAhsp65: vacina gênica contendo o gene da hsp65

DO: densidade óptica

EAE: encefalite autoimune experimental

*E. coli*: *Escherichia coli*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EM: esclerose múltipla

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

HSP: proteína de choque térmico

IFN-γ: interferon gama

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina-4, 5, 6, 10, 13...

i.m.: intramuscular

IPTG: isopropil β-tiogalactosídeo

KDa: kilodalton

MBP: proteína básica de mielina

M: molar

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

mL: mililitro

NK: célula *natural killer*

OPD: orto-fenilenodiamina

PBS: solução salina tamponada com fostato

pVAX: plasmídeo bacteriano usado como vetor

pVAXhsp65: vacina gênica

rhsp65: proteína de choque térmico 65 KDa recombinante

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RPMI: meio líquido para cultura de células (Roswell Park Memorial Institute)

SNC: sistema nervoso central

T $\gamma\delta$ : célula T gama delta

TB: tuberculose

Th: linfócito T auxiliar

TLR: receptor do tipo *toll*

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

Treg: Célula T regulatória

WHO: Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ABREVIATURAS

|          |                                                                    |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                            | <b>16</b> |
| 1.1      | RESPOSTA IMUNE NA TUBERCULOSE .....                                | 16        |
| 1.2      | VACINAS PARA TUBERCULOSE .....                                     | 19        |
| 1.3      | PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO: PAPEL NA AUTOIMUNIDADE .....          | 21        |
| 1.4      | ESCLEROSE MÚLTIPLA E ENCEFALITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL .....       | 22        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                             | <b>27</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                     | <b>29</b> |
| 3.1      | REAGENTES E ANIMAIS .....                                          | 29        |
| 3.1.1    | Purificação de DNA (vetor e vacina) .....                          | 29        |
| 3.1.2    | Obtenção de hsp65 recombinante (rhsp65) .....                      | 29        |
| 3.1.3    | Animais.....                                                       | 30        |
| 3.2      | IMUNIZAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ....             | 30        |
| 3.2.1    | Imunização com DNA .....                                           | 30        |
| 3.2.2    | Culturas celulares.....                                            | 31        |
| 3.2.3    | ELISA para detecção de anticorpos (anti-hsp65 e anti-mielina)..... | 31        |
| 3.2.4    | ELISA para detecção de citocinas .....                             | 32        |
| 3.3      | AVALIAÇÃO DA EAE.....                                              | 32        |
| 3.3.1    | Determinação do peso corpóreo e escore clínico .....               | 33        |
| 3.4      | COMITÊ DE ÉTICA .....                                              | 33        |
| 3.5      | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                           | 33        |
| <b>4</b> | <b>PROTOCOLOS E RESULTADOS .....</b>                               | <b>35</b> |
| 4.1      | PROTOCOLO EXPERIMENTAL I.....                                      | 35        |
| 4.1.1    | Resultados Protocolo Experimental I: Escore clínico .....          | 36        |
| 4.2      | PROTOCOLO EXPERIMENTAL II.....                                     | 40        |
| 4.2.1    | Resultados Protocolo Experimental II: Escore clínico .....         | 41        |

|     |                                                           |           |
|-----|-----------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3 | PROTOCOLO EXPERIMENTAL III.....                           | 45        |
|     | <b>4.3.1 Resultados Protocolo Experimental III: .....</b> | <b>46</b> |
|     | 4.3.1.1 Peso corpóreo e escore clínico dos animais .....  | 46        |
|     | 4.3.1.2 Níveis de anticorpos anti-mielina.....            | 49        |
|     | 4.3.1.3 Produção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ .....   | 50        |
| 4.4 | PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV .....                           | 52        |
|     | <b>4.4.1 Resultados Protocolo Experimental IV.....</b>    | <b>53</b> |
|     | 4.4.1.1 Produção de anticorpos anti-hsp65 .....           | 53        |
|     | 4.4.1.2 Produção de IFN- $\gamma$ .....                   | 54        |
| 4.5 | PROTOCOLO EXPERIMENTAL V .....                            | 55        |
|     | <b>4.5.1 Resultados Protocolo Experimental X.....</b>     | <b>56</b> |
|     | 4.5.1.1 Peso e escore clínico dos animais .....           | 56        |
|     | 4.5.1.2 Níveis de anticorpos anti-mielina.....            | 59        |
|     | 4.5.1.3 Produção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ .....   | 60        |
| 5   | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                    | <b>64</b> |
| 6   | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                   | <b>71</b> |
| 7   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                   | <b>73</b> |

## *Introdução*





## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 RESPOSTA IMUNE NA TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma 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. A associação com o vírus HIV e a situação de extrema pobreza de alguns países em desenvolvimento são condições que propiciam o aumento desses índices <sup>1</sup>. 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 <sup>2</sup>.

*M. tuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo e de crescimento lento <sup>3</sup>. A transmissão da tuberculose ocorre através da inalação de partículas contendo a bactéria, as quais são expelidas em forma de aerossol por indivíduos com a doença ativa <sup>4</sup>.

Apesar das estatísticas mostrarem um grande número de indivíduos infectados, uma parcela relativamente pequena dos indivíduos desenvolve a doença. Noventa por cento das pessoas infectadas desenvolvem uma forma latente e assintomática. Uma pequena porcentagem desses indivíduos (aproximadamente 10%) pode apresentar reativação da infecção, que poderia ser decorrente de um processo infeccioso secundário, de um quadro de imunossupressão, desnutrição, ou de elevado grau de exposição ao bacilo, entre outros fatores. Estas situações podem resultar em tuberculose ativa. Por outro lado, 5 a 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a doença progressiva logo após a infecção primária <sup>5,6,7</sup>.

A profilaxia da tuberculose é realizada pela administração da vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) que foi desenvolvida pelos pesquisadores Albert Calmette e Camille Guérin no Instituto Pasteur, em 1921 <sup>8,9,10</sup>. Esta vacina é constituída por uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* que foi atenuada através de várias subculturas *in vitro*.

Apesar da existência desta vacina, a reemergência da tuberculose nos últimos tempos pode ser atribuída a fatores relacionados a problemas sócio econômicos e de saúde pública como, por exemplo, o declínio nas condições de

vida da população mundial, declínio de recursos destinados às ações de controle da doença e problemas de ordem política e organizacional, enfrentados pelos sistemas de saúde pública em todo o mundo. Em países desenvolvidos, a incidência de tuberculose tem aumentado em função do elevado número de casos de co-infecção com HIV.

Além destes fatores, existem os problemas ligados à dificuldade de adesão de grande parcela dos pacientes aos esquemas terapêuticos. O tratamento da tuberculose é realizado por meio de quimioterapia, que combina o uso de diferentes antibióticos e tem duração de no mínimo seis meses. Por isso, é muito alto o número de casos de abandono do tratamento e, em razão disto, nos últimos anos, tem aumentado o número de pacientes portadores de cepas resistentes a múltiplas drogas <sup>11,12</sup>.

Como comentado anteriormente, a infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre através das vias aéreas superiores, por meio da inalação de gotículas contendo o bacilo, suspensas no ar, dispersas por um indivíduo infectado (bacilífero). A chegada dos bacilos nos pulmões desencadeia uma resposta imune baseada principalmente em mecanismos inatos, inicialmente com a ativação de macrófagos alveolares e de componentes do sistema complemento (via alternativa e da lectina). Após a interação com macrófagos, os bacilos são rapidamente fagocitados. Entretanto, durante o processo evolutivo da interação parasita-hospedeiro, o *M. tuberculosis* desenvolveu estratégias para escapar dos mecanismos microbicidas dos macrófagos. As próprias micobactérias induzem a ativação do sistema complemento gerando componentes que as opsonizam, facilitando, desta forma, a sua fagocitose através de interação com os receptores nos macrófagos <sup>13</sup>. Esse processo impede o mecanismo oxidativo, ou seja, a liberação de ROIs (Reagentes Intermediários do Oxigênio), que são tóxicos para *M. tuberculosis* <sup>14</sup>. Além disso, as micobactérias também produzem as enzimas catalase e superóxido dismutase que são capazes de degradar espécies reativas do oxigênio <sup>15</sup>.

Também tem sido descrito que o bacilo da tuberculose tem a capacidade de escapar do fagolisossoma ou impedir a fusão do endossoma ao fagolisossoma <sup>16</sup>. Este escape pode ocorrer através da interação preferencial com alguns dos receptores de macrófagos <sup>17</sup> e pela presença de determinados glicolipídeos na superfície micobacteriana, como o dimicolato de trealose (DMT) <sup>18</sup>. Componentes da

parede celular, como a lipoarabinomanana (LAM) também atuam na desativação de macrófagos <sup>19</sup>.

Através destes mecanismos de escape, a micobactéria é capaz de persistir no indivíduo infectado e desencadear a tuberculose mais tardiamente. Assim, a ativação de uma resposta imune adaptativa é essencial para o controle da infecção. Macrófagos e células dendríticas desempenham importantes funções na ativação de uma resposta específica constituída por células T <sup>6</sup>. Está bem estabelecido que a resposta protetora na tuberculose está relacionada ao desenvolvimento da resposta de perfil Th1, com secreção de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$  <sup>20,21</sup>. O IFN- $\gamma$  é uma das principais citocinas associadas à resposta protetora durante a infecção por micobactérias sendo produzido por células TCD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e NK <sup>22, 23, 24</sup>. O principal papel atribuído ao IFN- $\gamma$  e outras citocinas de padrão Th1 citadas acima, na resposta do hospedeiro contra a tuberculose, consiste na ativação e recrutamento de macrófagos capazes de controlar a infecção por micobactérias <sup>25,26</sup>. Além disso, Zhang et al <sup>27</sup>, mostraram que a secreção de IL-12 por macrófagos pleurais humanos é também importante. Essa citocina induz a ativação de células NK, estimulando-as a produzir IFN- $\gamma$  <sup>28</sup> ou aumentando sua capacidade citotóxica diretamente sobre as células infectadas e, além disso, estimula a diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> para o padrão Th1 <sup>29,30</sup>.

Além das células CD4<sup>+</sup> e macrófagos, um papel importante na resposta protetora contra tuberculose tem sido atribuído às células TCD8<sup>+</sup> citotóxicas. Esses linfócitos medeiam a lise de células infectadas por meio da formação de poros pela perforina e pela ação das moléculas efetoras granzimas e granzimas, ou, ainda, por mecanismos de Fas/FasL <sup>31</sup>. Célula TCD8<sup>+</sup> de camundongos infectados produzem IFN- $\gamma$  em resposta ao reconhecimento de antígenos de *M. tuberculosis* apresentados por células dendríticas ou macrófagos <sup>32</sup>. Além disso, cultura de linfócitos, provenientes de pulmão de animais infectados, na presença de células dendríticas, também infectadas, é capaz de ativar células TCD8<sup>+</sup> que reconhecem e lisam macrófagos infectados por *M. tuberculosis* <sup>29</sup>. Portanto, as principais células envolvidas na resposta imune específica contra a tuberculose são as T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> as quais são citotóxicas e produtoras de IFN- $\gamma$ .

Células T que expressam  $\gamma\delta$  também desempenham importante papel contra a tuberculose secretando citocinas tais como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , além de exercer

atividade citotóxica contra macrófagos infectados<sup>33,34,35,36</sup>. Finalmente, foi mostrado que células T duplo negativas (CD4-, CD8-) também participam do controle da infecção por *M. tuberculosis* e podem contribuir para o sucesso da vacinação<sup>37</sup>.

## 1.2 VACINAS PARA TUBERCULOSE

A única vacina disponível contra a tuberculose é o BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), que é constituída por uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*. Atualmente, mais de 80% das crianças de todo o mundo receberam BCG. A vacinação com BCG é considerada segura, sendo apropriada para administração no período neonatal. Estudos clínicos mostram, entretanto, que o nível de proteção dessa vacina alcançado em diferentes populações varia de 0 a 75%<sup>38</sup>. Além disso, o BCG interfere nos testes de sensibilidade para detecção da doença e não é totalmente seguro para indivíduos com infecção HIV/aids, por ser uma vacina constituída de microrganismos vivos<sup>39</sup>.

Uma das razões para esta variabilidade está relacionada com as diferentes cepas de BCG utilizadas nas diferentes populações. Outro aspecto relevante seria a viabilidade do bacilo, visto que a potência da vacinação está relacionada com a quantidade de bacilos viáveis. Estudos mostram que há uma variação de 5 a 45% na proporção de bacilos viáveis nas preparações vacinais. A via de administração também é importante. Inicialmente, o BCG era administrado via oral, mas, devido à inativação pela secreção gástrica, alterou-se sua via de inoculação para intradérmica, que é considerada mais eficaz<sup>40</sup>. Pesquisas recentes revelaram que exposição às micobactérias ambientais alteram os efeitos da imunização subsequente com BCG<sup>41</sup> e que esses microrganismos do meio ambiente mudaram o perfil da resposta imune induzida pela vacina, de Th1 para Th2<sup>42</sup>. Por estas razões, é necessário o desenvolvimento de uma nova vacina contra a 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. Quando administrado ao indivíduo, esse DNA permite a síntese da proteína imunogênica pelas próprias células do indivíduo vacinado e é capaz de

induzir resposta imune específica, celular e humoral, com memória imunológica. 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>. O tipo de resposta imune que ocorre após a vacinação depende, em parte, da via de administração. Quando o DNA é inoculado por via intramuscular, predomina uma resposta celular com produção de citocinas de padrão Th1, enquanto que após administração por via intradérmica predomina uma resposta de padrão Th2 <sup>43</sup>.

Para a obtenção desta vacina, o plasmídeo contendo o gene de interesse é inserido em uma bactéria, geralmente *Escherichia coli*, por transformação bacteriana. A bactéria, ao se replicar, permite que o plasmídeo se reproduza em larga escala, o que é fundamental para a produção da vacina <sup>44</sup>. Além do gene de interesse, esta construção vacinal possui seqüência promotora ativa em mamíferos, seqüência sinal para finalização da transcrição, gene de resistência a antibiótico, origem de replicação e seqüência poli A para estabilização do mRNA. Normalmente os plasmídeos também possuem seqüências de nucleotídeos, chamadas de “motifs” CpG (citosina-fosfato-guanina não metiladas), as quais têm sido responsabilizadas pelo aumento da imunogenicidade deste tipo de vacina, pois estimulam a produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 <sup>43, 45</sup>.

Os mecanismos envolvidos na ativação da resposta imune humoral e celular pelas vacinas de DNA plasmideal ainda não foram completamente elucidados. Alguns autores propõe que a indução de resposta imune possa ter início após a transfecção de uma célula somática (não apresentadora profissional de antígeno) enquanto outros autores tem demonstrado a importância de células CD11b<sup>+</sup> ou CD11c<sup>+</sup> da medula óssea na indução da resposta imune <sup>43</sup>. De qualquer modo, antígenos produzidos no citoplasma da célula hospedeira são processados por várias enzimas e os fragmentos resultantes são apresentados na superfície celular juntamente com moléculas de classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) para linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Por outro lado, parte dos antígenos produzidos pelos miócitos ou Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) são processados e apresentados no contexto de MHC classe II ou secretados sem sofrerem processamento, podendo estimular tanto linfócitos B a produzirem anticorpos específicos, como serem endocitados por outras APCs e estimularem linfócitos T CD4<sup>+</sup> <sup>45</sup>.

Uma vacina gênica para tuberculose baseada no gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65) do *Mycobacterium leprae*, denominada pVAXhsp65, vem sendo atualmente estudada no Brasil. A partir da constatação inicial de que esta vacina induzia imunidade protetora contra a TB experimental <sup>46</sup>, vários ensaios pré-clínicos foram realizados no sentido de esclarecer o tipo de resposta imune induzido e também otimizar esta formulação <sup>47,48</sup>.

Para que esta vacina passe para a fase de ensaios clínicos, a mesma deverá ser avaliada quanto ao seu potencial de desencadear efeitos colaterais. No caso específico da hsp65 micobacteriana, em função da homologia com a hsp60 dos vertebrados, esta vacina precisa ser testada quanto à indução ou modulação de doenças autoimunes. Além disto, esta vacina administrada por via intramuscular induz uma resposta predominantemente Th1 o que também poderia contribuir para quadros de autoimunidade mediados por resposta Th1

### 1.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO: PAPEL NA AUTOIMUNIDADE

As proteínas de choque térmico (heat shock proteins - hsps) foram originalmente identificadas como um grupo de proteínas induzidas pelo choque térmico. Entretanto, logo foi esclarecido que outras situações de estresse também induziam sua síntese, tais como fatores de crescimento, inflamação, infecção, hipóxia e irradiação <sup>49,50</sup>.

As hsps são categorizadas em 4 famílias principais, em função de seus pesos moleculares: hsp90, hsp70, hsp60 e hsps menores. Dentre as várias atividades biológicas das hsps se destaca a atividade de chaperona, a qual assegura, por exemplo, que polipeptídeos em fase de síntese sofram os dobramentos adequados ou que proteínas não sofram agregação em condições de estresse. <sup>51,52</sup>. Uma característica marcante das hsps é o elevado grau de homologia. Por exemplo, a hsp60 humana tem 50% de identidade com a proteína micobacteriana correspondente, determinando portanto, a existência de várias áreas idênticas nas duas moléculas <sup>52,50</sup>. Apesar deste elevado grau de conservação, as hsps são imunógenos imunodominantes, sendo que parte substancial da resposta imune contra microrganismos patogênicos é direcionada para peptídeos derivados

destas proteínas<sup>53,54</sup>. Em vista da similaridade genética entre as hsps de mamíferos e as microbianas e o consequente potencial para uma reatividade imunológica cruzada, esta imunodominância foi entendida, inicialmente, como uma provável causa de autoimunidade.

Vários achados implicaram as hsps, em especial a hsp60 e 70, como autoantígenos envolvidos na artrite, esclerose múltipla e diabetes<sup>55, 56, 57</sup>. Entretanto, esta hipótese não foi comprovada, pois a inoculação de hsps não induziu patologias autoimunes na maioria dos protocolos utilizados. Ao contrário, em muitos modelos experimentais de doenças autoimunes, observou-se que a imunização com estes antígenos impedia o desenvolvimento de autoimunidade induzida posteriormente<sup>50</sup>. As principais evidências deste efeito protetor foram obtidas a partir da artrite experimental. Na artrite por adjuvante em ratos (AA), esta resistência foi induzida tanto por imunização com hsp60 micobacteriana associada ao Adjuvante Incompleto de Freund<sup>58</sup> quanto por vacinação genética com o gene da hsp60 micobacteriana<sup>59</sup>. Vários outros procedimentos também evitaram o desenvolvimento da AA, tais como imunização com o vírus recombinante da vaccinia expressando hsp60 humana ou micobacteriana ou a administração oral de hsp60.<sup>60,61,62</sup> A pré-imunização com hsp60 também foi protetora em modelos experimentais de artrite desencadeadas por componentes da parede celular de estreptococos, avridine e pristane<sup>63,64,65</sup>. Além destas observações na artrite experimental, foi constatado que processos inflamatórios eram acompanhados de ativação de células T autorreativas para hsps<sup>66</sup>. Os estudos relatados acima, juntamente com outras investigações, permitiram concluir que a proteção induzida pela hsp60 se deve ao efeito de células T anti-inflamatórias induzidas pelo aumento de expressão de hsps próprias nos sítios inflamatórios os quais ocorreriam tanto em doenças autoimunes quanto em doenças infecciosas<sup>50,67</sup>. A caracterização fenotípica destas células reguladoras, o esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta regulação e sua utilização para o tratamento de doenças autoimunes, têm sido descritos recentemente<sup>68, 69,70</sup>.

#### 1.4 ESCLEROSE MÚLTIPLA E ENCEFALITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC). Tem sido descrita como a principal causa de incapacidade neurológica em adultos jovens e apresenta substanciais custos econômicos, pessoais e sociais <sup>71</sup>. A maioria dos pacientes apresenta um quadro transitório de sintomas, com recidivas da doença, seguidos por uma fase secundária progressiva, caracterizada por perdas irreversíveis e neurodegeneração. A etiologia da EM inclui uma reação autoimune contra a mielina no SNC <sup>72,73</sup>. As principais características histológicas da EM são infiltração de células T, B e macrófagos, além da degradação da mielina, que se estende aos axônios e astrócitos <sup>74</sup>.

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 <sup>75,76</sup>. A participação desta resposta anti-hsp na EM, se benéfica ou deletéria, ainda não está esclarecida.

A encefalite autoimune experimental, ou encefalite alérgica experimental (EAE), como denominada inicialmente, é considerada um modelo animal para o estudo da 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 <sup>77</sup>. Por volta de 85% dos modelos experimentais de EAE utilizam ratos, enquanto que 42% utilizam camundongos, indicando que a EAE no rato é um modelo bastante indicado para investigar esta patologia. Uma única inoculação com homogenato de medula espinhal, mielina ou peptídeos encefalitogênicos derivados de mielina associados ao ACF, resultam em uma incidência de quase 100% de EAE.

A EAE no rato Lewis é caracterizada como uma doença aguda, grave e monofásica com recuperação espontânea. A gravidade da EAE tem sido relacionada com a dose de micobactérias presente no inóculo; altas doses de mielina induzem doença grave, enquanto que baixas doses desencadeiam doença mais branda.



Todos os ratos imunizados mostram infiltração de células T no SNC, acompanhada de ativação da micróglia <sup>78</sup>. As características histopatológicas da EAE no rato Lewis incluem infiltração mononuclear meníngea, perivascular e parenquimal no SNC <sup>77</sup>. 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, tais como indução de tolerância por via oral <sup>79</sup>, tratamento com citocinas e imunoterapia baseada em células dendríticas.

A participação da hsp65 na EAE tem sido menos investigada do que na artrite e no diabetes experimental. Entretanto, a análise de células infiltrantes na EAE em ratos mostrou elevada frequência de células T específicas para proteína básica e para hsp65 <sup>80</sup>.

Apesar da presença evidente de resposta anti-hsp65 na EM e na EAE, sua contribuição benéfica ou deletéria ainda não foi elucidada. Uns poucos trabalhos têm sugerido que a resposta anti-hsp possa contribuir para baixar a incidência e gravidade desta doença <sup>81,82</sup>.

Dentro deste contexto, é possível que a imunização com a vacina gênica contendo o gene da hsp65 acelere ou agrave um quadro de esclerose múltipla. Isto poderia ocorrer por ser a resposta imune induzida do tipo Th1 e pela hsp65 micobacteriana apresentar mimetismo antigênico com a hsp60 humana. Por outro lado, o reconhecimento imunológico de hsps bacterianas, em especial da hsp65, parece ser parte de uma estratégia geral do sistema imunológico para controlar o desenvolvimento de doenças autoimunes, podendo a vacinação, neste caso, proteger contra a EM.

Portanto, nosso objetivo principal neste trabalho é investigar se a imunização com a vacina pVAXhsp65, por via intramuscular, agrava de alguma forma o desenvolvimento da EAE, considerada um bom modelo de esclerose múltipla. Esta avaliação é fundamental na fase pré-clínica, pois um efeito deletério sobre uma doença tão grave quanto à esclerose múltipla inviabilizaria o uso desta construção vacinal. Além disso, o mesmo procedimento experimental permitirá avaliar um possível potencial profilático da pVAXhsp65 nesta doença autoimune. Esta investigação terá que ser precedida da padronização da encefalite autoimune experimental em ratos Lewis.



## *Objetivos*



---

## **2 OBJETIVOS**

2.1. Padronizar o modelo de encefalite autoimune experimental em ratos Lewis.

2.2. Avaliar as características da resposta imune induzida pela vacina pVAXhsp65 em ratos Lewis.

2.3. Avaliar o possível efeito imunomodulador da vacina pVAXhsp65 nas características clínicas e imunológicas da EAE em ratos Lewis.

## *Material e Métodos*



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E ANIMAIS

##### 3.1.1 Purificação de DNA (vetor e vacina)

O vetor e a vacina foram obtidos a partir do crescimento da bactéria *E. coli* transformada em meio LB com ampicilina (100 µg/mL) durante uma noite, a 37°C, em agitador a 200 rpm. Após o crescimento, a massa de bactérias foi sedimentada por centrifugação a 10.000 g por 5 minutos e a purificação dos plasmídeos realizada de acordo com o protocolo descrito no kit Maxiprep (Gibco). Ao sedimento formado foram adicionados 10 mL do tampão de suspensão contendo RNase A e 10 mL de solução de lise; a suspensão foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução alcalina (solução de neutralização), invertendo cuidadosamente e incubando por mais 10 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 15.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e aplicado em coluna de troca iônica previamente equilibrada com tampão específico. A seguir, a coluna foi lavada e o DNA eluído. A essa etapa seguiu-se a adição de 15 mL de isopropanol ao eluato e centrifugação por 30 minutos a 28.000 g. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento formado foi adicionado 1 mL de tampão TE. O DNA obtido foi quantificado no GENE QUANT (Pharmacia Biotech) e, em seguida, amostras do DNA purificado foram digeridas para posterior análise da presença do inserto em gel de agarose 0,8%.

##### 3.1.2 Obtenção de hsp65 recombinante (rhsp65)

*Escherichia coli* DH5α contendo o plasmídeo que codifica a hsp65 foi cultivada na presença de 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 6M, 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, aliquoteada e armazenada a -20°C.

O material obtido foi testado quanto à presença de contaminação com LPS pelo teste cromogênico do lisado de amebócito de *Limulus polyphemus*. Foram consideradas amostras livres de endotoxina, e portanto adequadas para uso neste trabalho, aquelas que apresentavam valores menores que 0,1 UE/μg de proteína.

### 3.1.3 Animais

Foram utilizados ratos Lewis fêmeas com 2 a 4 semanas de idade oriundos do CEMIB (Unicamp). Estes animais foram referidos como colônia CEMIB. O número de animais por grupo experimental variou de 3 a 8 animais. A fase inicial de padronização também incluiu o estabelecimento de uma colônia de ratos Lewis no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências – Unesp – Botucatu, cujas matrizes foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Sato do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP. Estes animais foram referidos como colônia Botucatu.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, alojados em caixas plásticas com água e alimentos *ad libitum* e mantidos sob cuidados especiais, o que incluía limpeza constante do ambiente e esterilização da água e da ração oferecidas. Além disso, somente os pesquisadores diretamente envolvidos no projeto tinham acesso à sala dos animais. A entrada nesta sala, reservada somente para este projeto, exigia uso de propés, avental, luvas e máscara.

## 3.2 IMUNIZAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

### 3.2.1 Imunização com DNA

O plasmídeo (pVax) e a vacina (pVAXhsp65) purificados foram diluídos em salina e suas concentrações acertadas para 1 µg/µL ou 2 µg/µL. A estas soluções acrescentou-se sacarose (concentração final de 10 - 12%). Cada animal recebeu 3 doses de 100 µL de preparação vacinal, contendo 100 µg de DNA, administrada no músculo quadríceps. O intervalo de tempo entre as doses foi de 15 dias.

### 3.2.2 Culturas celulares

Após o sacrifício dos animais, os baços foram retirados e divulsionados. As suspensões celulares foram lavadas com PBS e o sedimento celular coletado através de centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. O número de células nestas suspensões foi ajustado para  $5 \times 10^6$  células / mL em meio RPMI 1640 contendo gentamicina (100.000 U/mL), L-glutamina e 10% de soro bovino fetal. Em seguida, as células foram distribuídas em placas de 48 poços (1 mL). Posteriormente, foram adicionados os seguintes estímulos: ConA (5 µg/mL de cultura), rhsp65 (10 µg/mL de cultura) e mielina (10 µg/mL de cultura). Após 48 horas de incubação a 37°C em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

### 3.2.3 ELISA para detecção de anticorpos (anti-hsp65 e anti-mielina)

Para a detecção de anticorpos específicos, placas de 96 poços foram recobertas com 100 µL/poço de rhsp65 ou mielina diluídas em tampão de ligação (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 17mM, NaHCO<sub>3</sub> 9,6 mM, pH 9,6) na concentração de 5 µg/mL 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 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 (rhsp65) e 1/1000 (mielina) em tampão de bloqueio 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 biotinilado anti-IgG1 ou anti-IgG2b de rato (Oxford Biotechnology) diluído em tampão de bloqueio nas concentrações de 500 ng/mL e 250 ng/mL,



respectivamente. Após incubação seguida de lavagem das placas, as mesmas foram incubadas com 100  $\mu$ L por poço de complexo estreptavidina-peroxidase (StrepAB - Dako Corporation) diluído em tampão bloqueio, sob o abrigo da luz, por 30 minutos, em temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi revelada com 100  $\mu$ L por poço de solução de OPD (Sigma Chemical) e  $H_2O_2$  e a reação interrompida com a adição de 50  $\mu$ L por poço de  $H_2SO_4$  a 16%. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA a 492 nm.

### 3.2.4 ELISA para detecção de citocinas

Os sobrenadantes de cultura de baço foram avaliados quanto à produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN- $\gamma$  e anti-TNF- $\alpha$  de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS na concentração 2  $\mu$ g/mL e 4  $\mu$ g/mL, respectivamente. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS – Tween 20 (0.05%) foram adicionados 300  $\mu$ L da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, a 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 por duas horas em temperatura ambiente com os anticorpos biotinilados anti-IFN- $\gamma$  e anti-TNF- $\alpha$  de rato, diluídos em tampão PBS contendo 1% de albumina na concentração 150 ng/mL e 100 ng/mL durante 2 horas, respectivamente. Posteriormente, fez-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. A reação foi interrompida por adição de  $H_2SO_4$  16% e a leitura realizada em 492 nm.

## 3.3 AVALIAÇÃO DA EAE

Na fase de padronização, os animais foram inoculados com doses de 50 ou 100 µg da emulsão contendo mielina (50 µg), associada ao Adjuvante Completo de Freund's (Adjuvante incompleto de Freund's mais *M. butyricum*) no dorso ou no coxim plantar.

### 3.3.1 Determinação do peso corpóreo e escore clínico

Os animais foram pesados no dia da imunização com mielina e diariamente até o dia do sacrifício.

O escore clínico dos animais também foi monitorado diariamente e descrito segundo uma escala que variou de 0 a 5. Os seguintes critérios clínicos foram utilizados para classificar o animal dentro desta escala: 0- sem nenhuma alteração do movimento, 1 - cauda parcialmente frouxa, 2 - cauda frouxa, 3 - paraparesia moderada, 4 - paraplegia ou tetraplegia e 5 – moribundo. Escore clínico elevado (3-4) foi o critério utilizado para definir a fase aguda enquanto que a diminuição deste escore para 1 ou zero definiu a fase de recuperação .

## 3.4 COMITÊ DE ÉTICA

Os experimentos foram realizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética Animal da Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu.

## 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados empregando-se o programa Graph Pad Software (San Diego, CA, USA, 1993). Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida de comparação pelo método de Tukey. Valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## *Protocolos e Resultados*

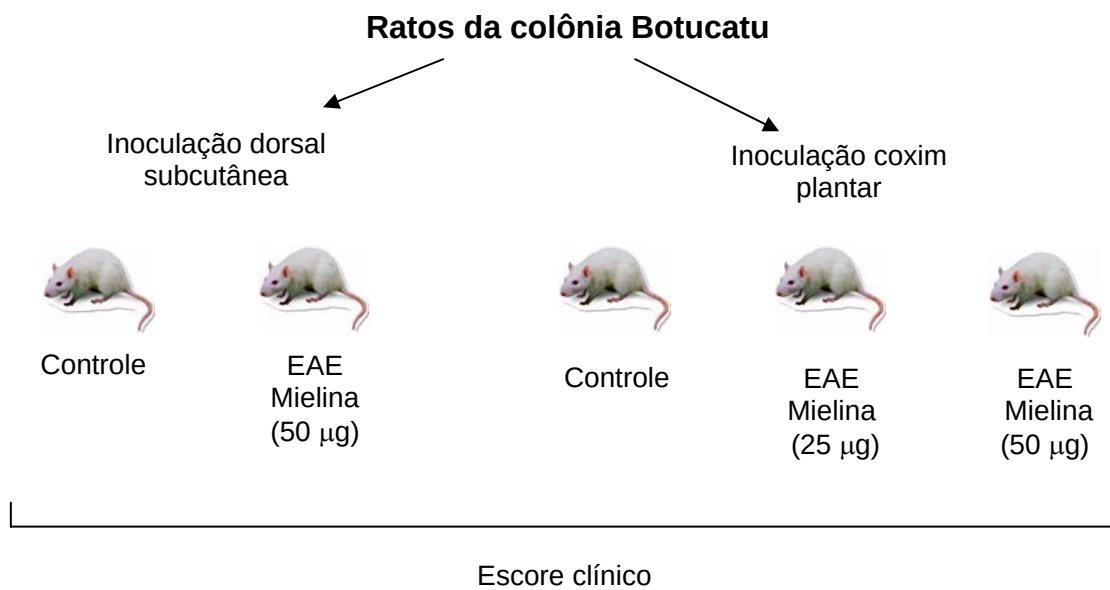


## 4 PROTOCOLOS E RESULTADOS

Para atingirmos os objetivos definidos anteriormente, utilizamos os protocolos experimentais I, II, III, IV e V 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:** Padronização da Encefalite Autoimune Experimental em ratos Lewis mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências – Unesp – Botucatu, com matrizes vindas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP.



#### 4.1.1 Resultados Protocolo Experimental I: Escore clínico

Após a imunização com mielina no dorso ou no coxim plantar com 50 ou 100  $\mu$ l de emulsão, os animais foram avaliados quanto ao escore clínico.

Os resultados de escore clínico são mostrados nas figuras abaixo (1, 2 e 3).

A figura 1 mostra os resultados obtidos nos animais inoculados com 100  $\mu$ L da emulsão (50  $\mu$ g de mielina), no dorso, pela via intradérmica. Nesta etapa, os animais atingiram, entre o 12° e 15° dia, somente o escore 1 (cauda parcialmente frouxa) e, após este período, recuperaram-se atingindo novamente o escore 0.

A figura 2 apresenta os resultados dos animais inoculados com 50  $\mu$ l da emulsão (25  $\mu$ g de mielina), no coxim plantar. Os resultados foram semelhantes aos encontrados na figura 1, sendo que os animais inoculados com mielina atingiram somente escore 1.

Na figura 3 são apresentados os resultados de imunização com mielina, também no coxim plantar, porém com a dose de 100  $\mu$ l da emulsão. Neste caso, como pode ser observado na figura abaixo, um animal atingiu o escore 1, o outro o escore 2 e o último escore 3. Os resultados foram, portanto, melhores mas não foram homogêneos.

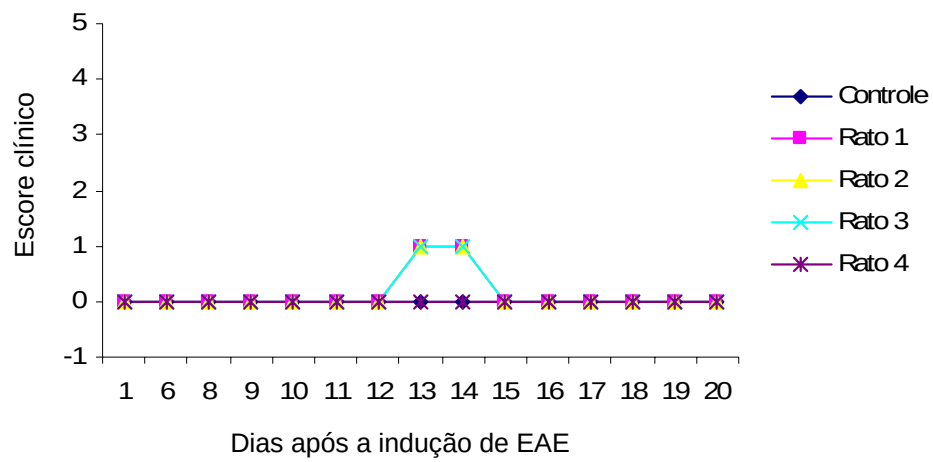


Figura 1 – Escore clínico em ratos Lewis da colônia Botucatu, submetidos à indução de EAE por imunização no dorso com 100 µl de emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF. Os escores clínicos foram avaliados diariamente. Resultados representam os escores clínicos individuais dos 4 animais imunizados. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.

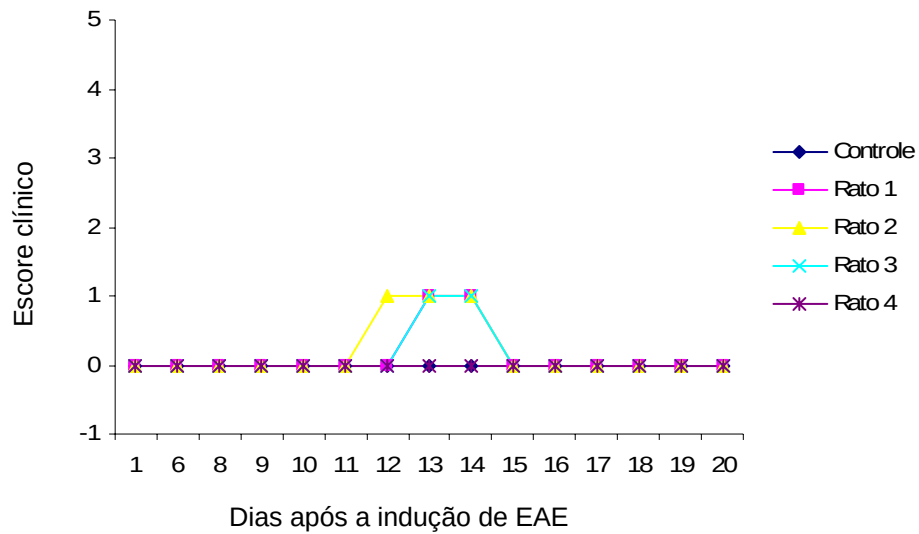


Figura 2 - Escore clínico em ratos Lewis da colônia Botucatu, submetidos à indução de EAE por imunização no coxim plantar com 50 µl da emulsão (mielina 25 µg) associada ao ACF. O escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados representam os escores clínicos individuais dos 4 animais imunizados. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.

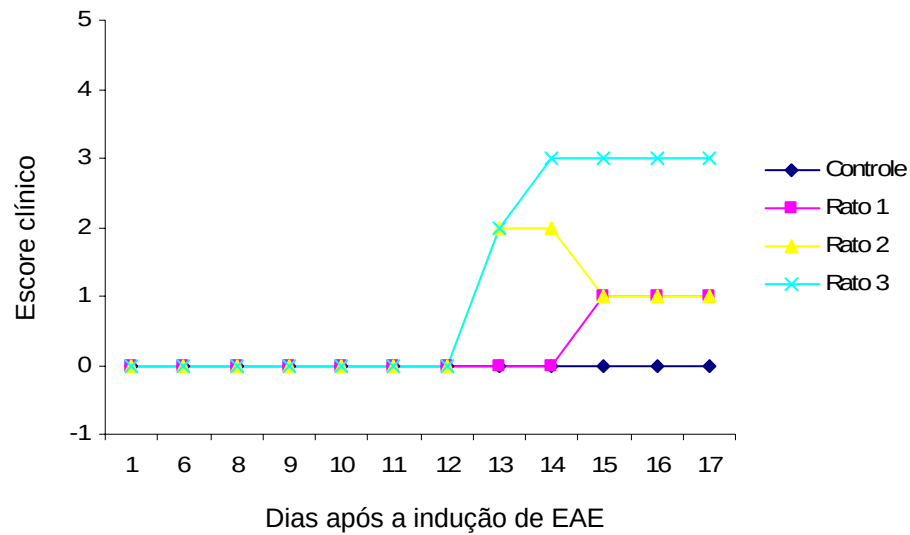
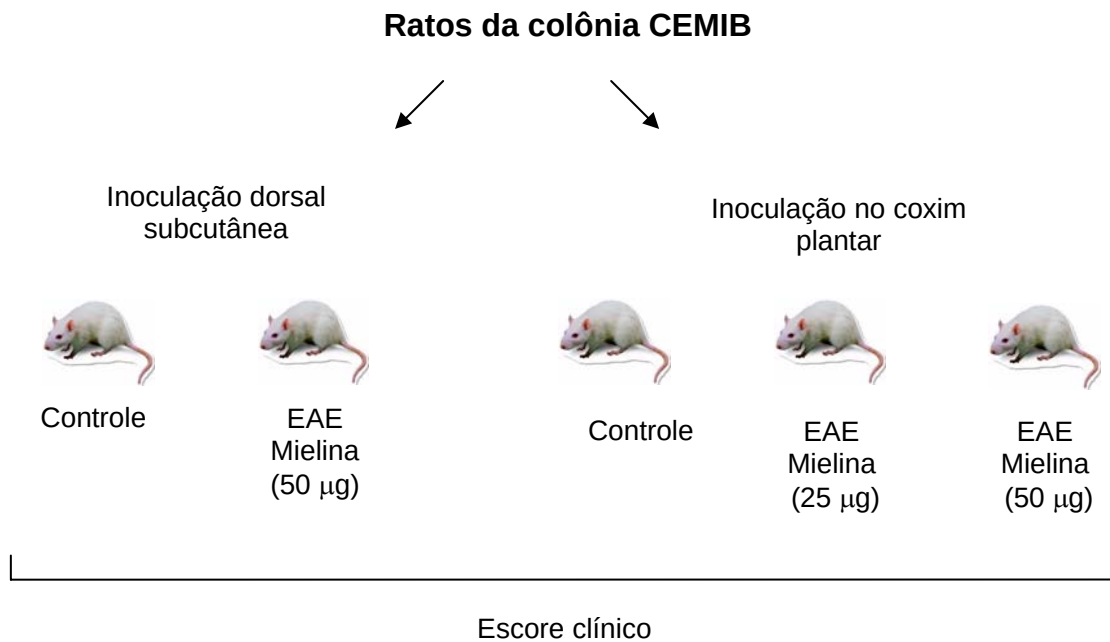


Figura 3 – Escore clínico em ratos Lewis da colônia Botucatu, submetidos à indução de EAE por imunização no coxim plantar com 100 µl emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF. O escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados representam os escores clínicos individuais dos 3 animais imunizados. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.



**Objetivo:** Padronização da Encefalite Autoimune Experimental em ratos Lewis adquiridos no CEMIB – Unicamp.



#### 4.2.1 Resultados Protocolo Experimental II: Escore clínico

Neste protocolo, ratos Lewis da colônia CEMIB foram submetidos aos mesmos esquemas de indução de EAE utilizados na colônia Botucatu.

Em uma primeira etapa, testamos a inoculação pela via intradérmica (dorsal), com a maior dose da emulsão utilizada nos protocolos anteriores (100  $\mu$ l). Como documentado na figura 4, um animal deste grupo experimental atingiu o escore 4 da EAE e os outros dois animais chegaram a apresentar escore 3. Todos recuperaram-se espontaneamente após este período.

Posteriormente, utilizamos a dose de 50  $\mu$ l da emulsão inoculada no coxim plantar, e obtivemos resultados muito semelhantes aos verificados na figura 4, sendo que um animal do grupo atingiu o escore 4 da EAE e os outros dois animais do grupo chegaram a apresentar escore 3. Todos recuperaram-se espontaneamente após este período.

Na figura 6 são apresentados os resultados do escore clínico dos animais imunizados com a dose de 100  $\mu$ l da emulsão, no coxim plantar. Todos os animais imunizados com mielina atingiram o escore clínico 4 no período entre o 10° e 14° dia. Após o 14° dia os animais começaram a manifestar recuperação espontânea, sendo que no 21° dia todos atingiram novamente o escore clínico 0.

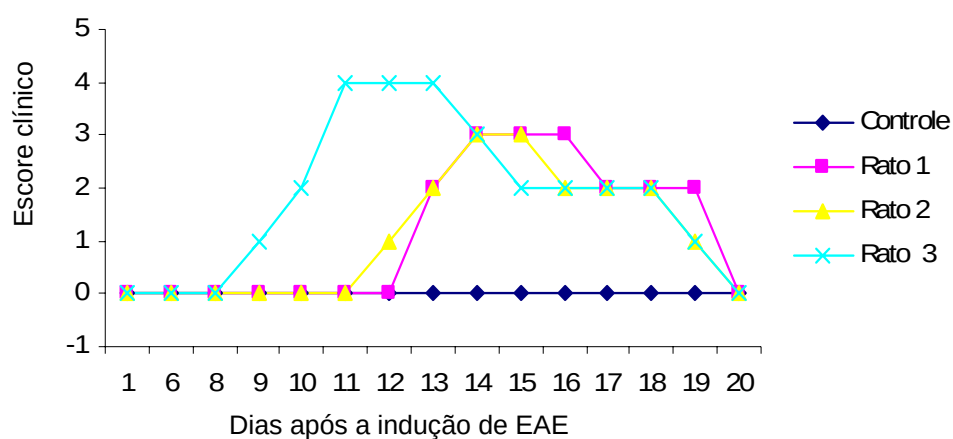


Figura 4 – Escore clínico em ratos Lewis da colônia CEMIB, submetidos à indução de EAE por imunização no dorso com 100 µl da emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF. O escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados representam os escores clínicos individuais dos 3 animais. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.

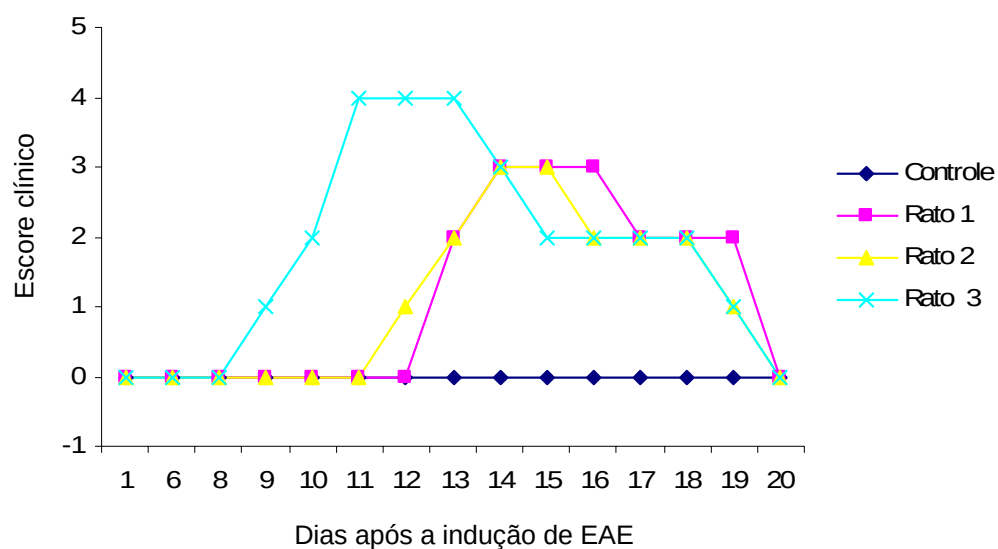


Figura 5 – Escore clínico em ratos Lewis da colônia CEMIB, submetidos à indução de EAE por imunização no coxim plantar com 50  $\mu$ l da emulsão (mielina 25  $\mu$ g) associada ao ACF. O escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados apresentam escores clínicos individuais de 3 animais. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.

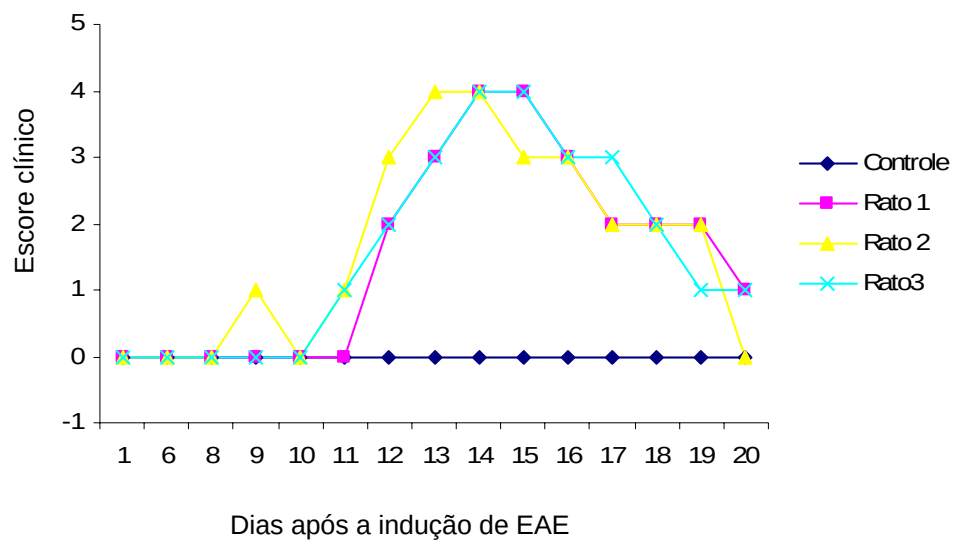
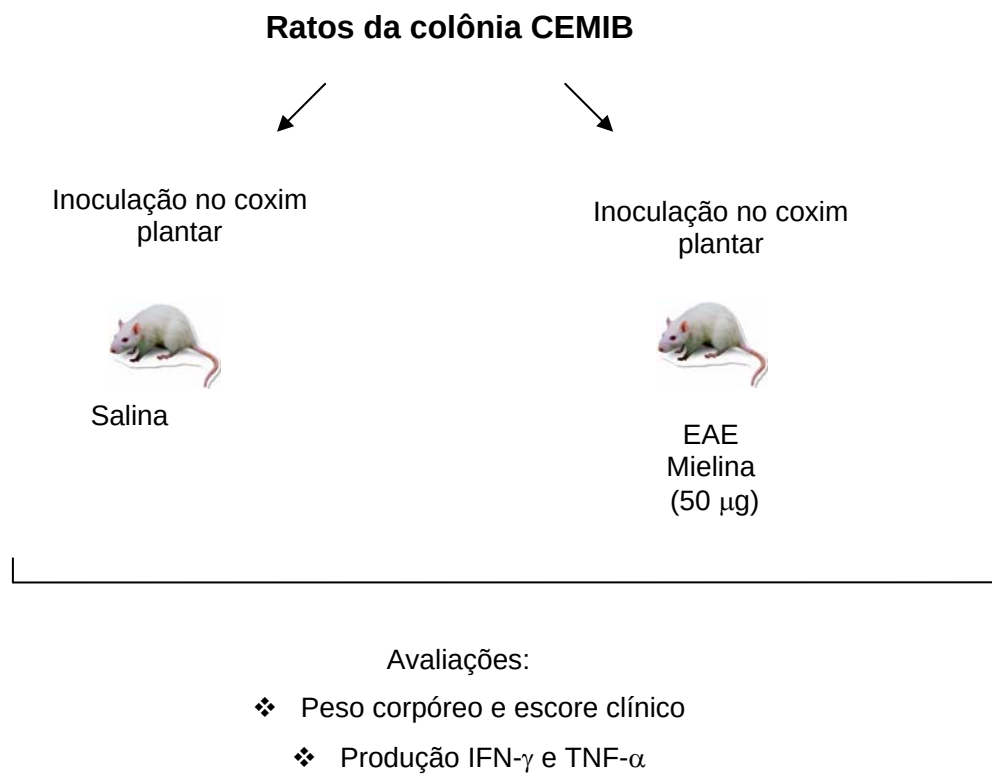


Figura 6 – Escore clínico em ratos Lewis da colônia CEMIB, submetidos à indução de EAE por imunização no coxim plantar com 100 µl da emulsão (mielina 50 µg) associada ao ACF e o escore clínico foi avaliado diariamente. Resultados apresentam escore clínico individual dos 3 animais. Somente um controle foi incluído para facilitar a visualização.

### 4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL III

**Objetivo:** Padronização da Encefalite Autoimune Experimental em ratos Lewis adquiridos no CEMIB – Unicamp.



### **4.3.1 Resultados Protocolo Experimental III:**

#### **4.3.1.1 Peso corpóreo e escore clínico dos animais**

Após a imunização com mielina os animais foram diariamente pesados e avaliados quanto ao aparecimento dos sintomas típicos da EAE. O peso médio dos animais, no início do experimento, foi de 150 gramas. Os animais do grupo controle apresentaram um ganho de peso constante durante o experimento, tendo atingido média de 186 gramas no 20º dia.

Os animais imunizados com mielina começaram a perder peso a partir do 10º dia após a imunização, como pode se observar na figura 7a, na qual são mostrados os resultados individuais. Estes mesmos resultados são mostrados na forma de média na figura 7b.

Os resultados referentes ao escore clínico são mostrados na figura 8a (resultados individuais) e 8b (média). Como pode se observar, entre os dias 10 e 12 todos os animais apresentaram sintomatologia clínica com escores que atingiram até o nível 4. Entre os dias 15 e 16 estes sintomas começaram a diminuir. No 20º dia a sintomatologia tinha regredido em todos os animais, atingindo escores 0 ou 1.

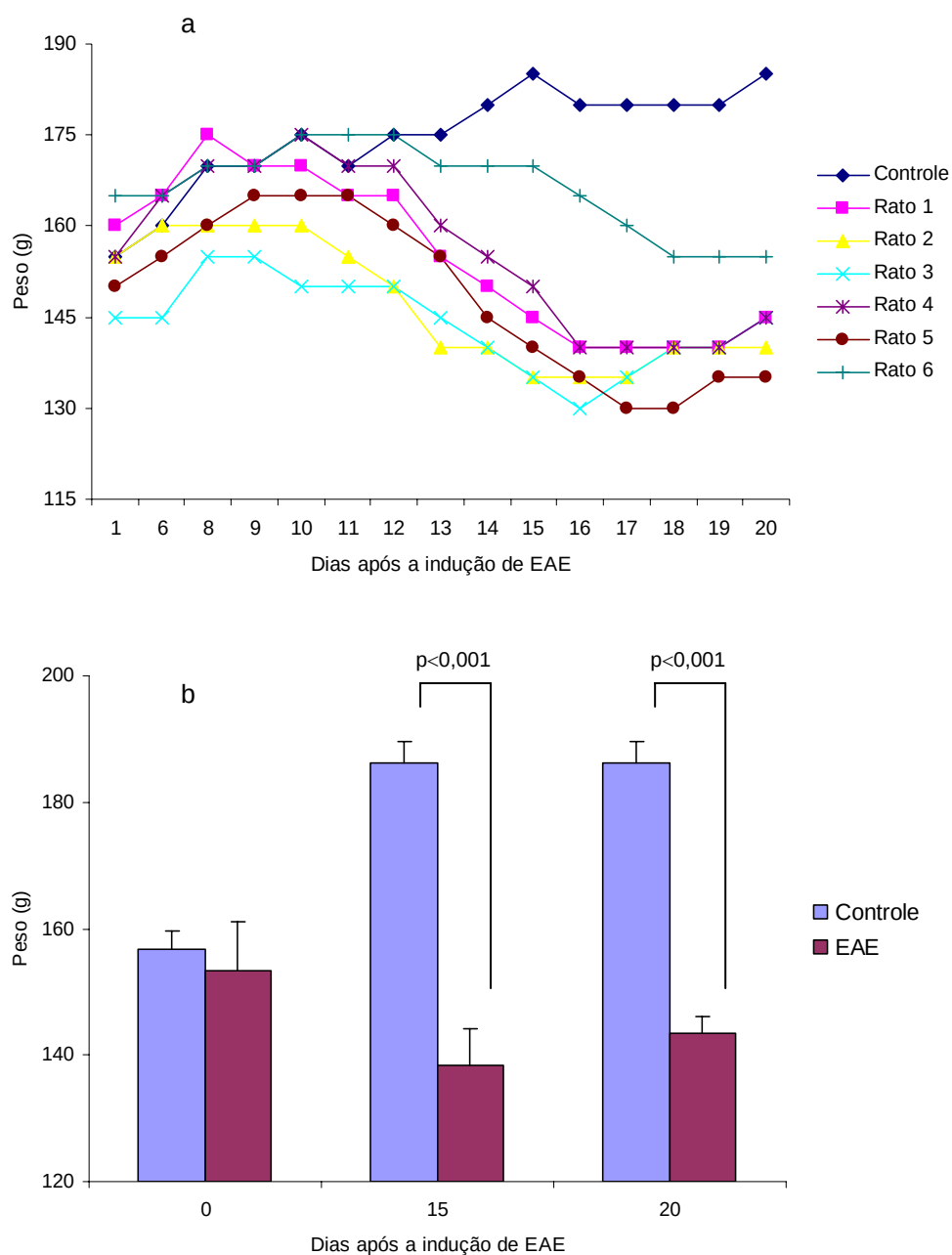


Figura 7 – Evolução do peso corpóreo de ratos Lewis submetidos ao processo de indução de EAE por imunização no coxim plantar com 100  $\mu$ l da emulsão (mielina 50  $\mu$ g) associada ao ACF. Os pesos individuais dos 6 animais foram avaliados diariamente. a) Pesos individuais (somente um controle foi incluído para facilitar a visualização). b) Peso médio  $\pm$  desvio médio.



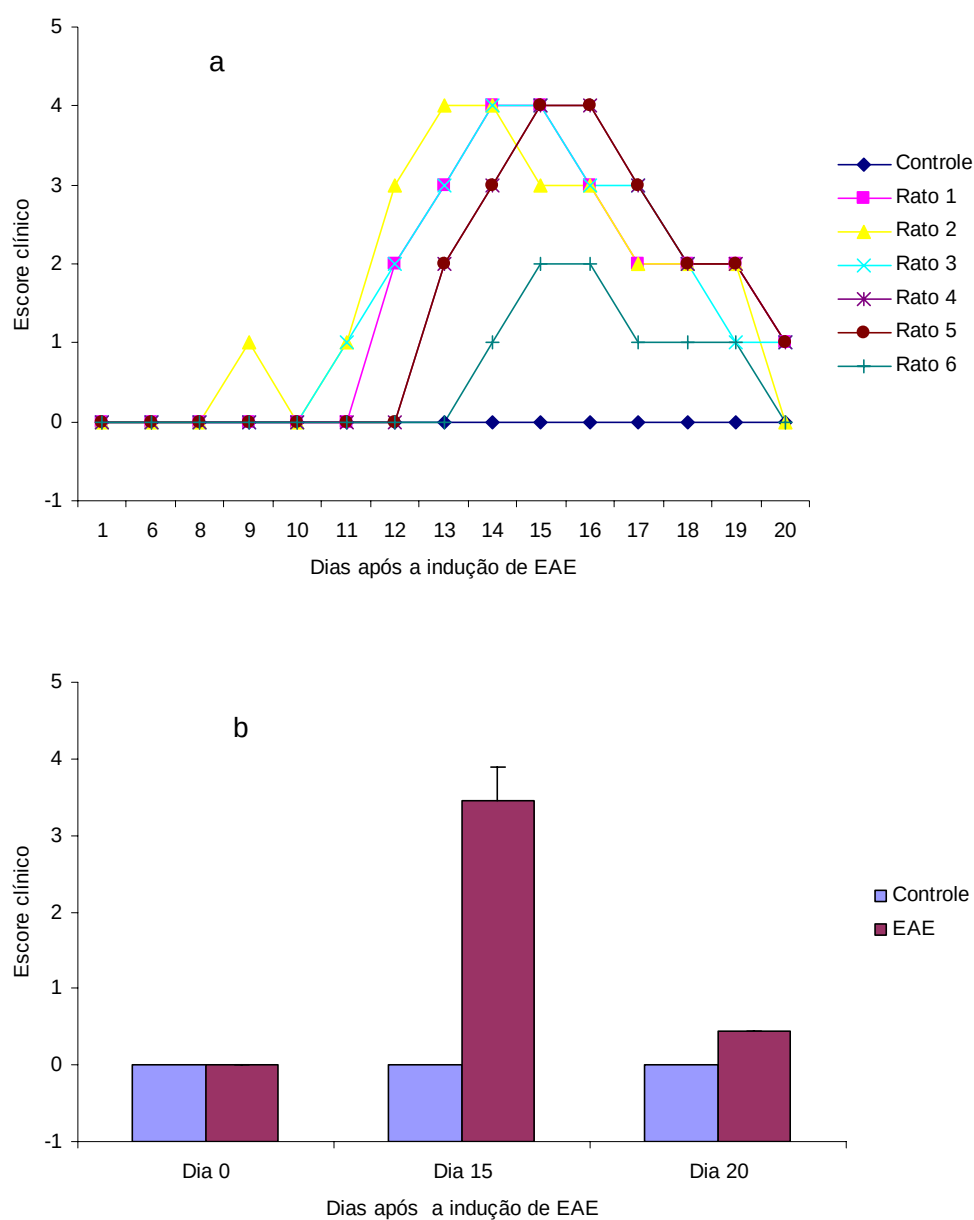


Figura 8 – Escore clínico em ratos Lewis submetidos ao processo de indução de EAE por imunização no coxim plantar com 100  $\mu$ l da emulsão (mielina 50  $\mu$ g) associada ao ACF. Os escores clínicos de 6 animais foram avaliados diariamente. a) Escore individual dos animais (somente um controle foi incluído para facilitar a visualização). b) Escore médio  $\pm$  desvio médio.

#### 4.3.1.2 Níveis de anticorpos anti-mielina

Os animais imunizados com 100  $\mu$ g da emulsão contendo mielina e ACF foram submetidos à eutanásia na fase aguda (15º dia) e na fase de recuperação (20º dia). Nestes dois períodos foram coletadas amostras de soro e os níveis de anticorpos foram avaliados por ELISA. Foi constatada produção significativa de anticorpos específicos tanto IgG1 (figura 9a) quanto IgG2b (figura 9b) nas duas fases da doença.

Na fase de recuperação o nível dos dois isotipos testados foi mais elevado em comparação com a fase aguda, porém este aumento só foi significativo no caso de IgG2b.

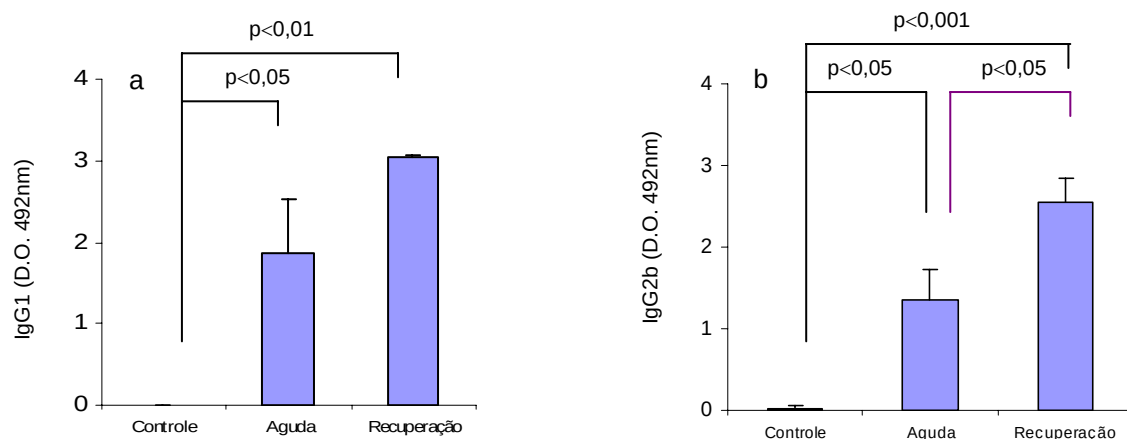


Figura 9 - Nível de anticorpos séricos anti-mielina em ratos Lewis submetidos à indução de EAE por imunização com mielina (50  $\mu$ g) associada com ACF. Os níveis de anticorpos foram avaliados em amostras de soro obtidas nas fases aguda (15º dia) e de recuperação (20º dia). As dosagens foram feitas por ELISA em amostras de soro diluídas 1:1000. Os resultados representam a média de 3 animais por grupo  $\pm$  desvio médio.

#### 4.3.1.3 Produção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$

O desenvolvimento da encefalite foi acompanhado de produção significativa de IFN- $\gamma$  (figura 10a) e TNF- $\alpha$  (figura 11a) por células esplênicas estimuladas com mielina nas duas fases da doença. Níveis mais elevados destas citocinas foram observados nas culturas esplênicas realizadas durante a fase aguda em comparação com a fase inicial de recuperação, entretanto, esta diferença não foi significativa.

Nas culturas estimuladas com ConA, como esperado, os níveis de IFN- $\gamma$  (figura 10b) e TNF- $\alpha$  (figura 11b) também estavam igualmente elevados nos 3 grupos experimentais.

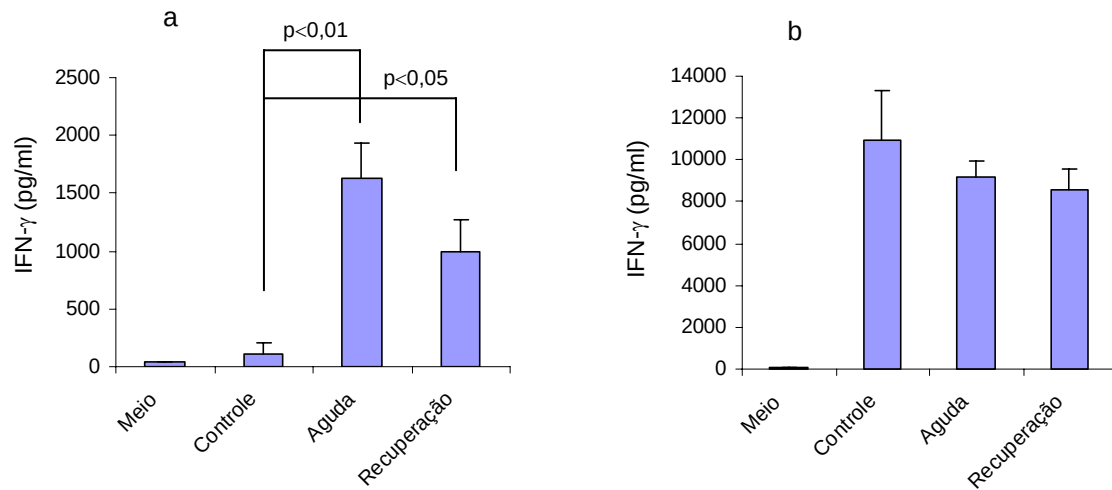


Figura 10 - Produção de IFN- $\gamma$  (pg/mL) por células esplênicas de ratos Lewis com EAE. Células esplênicas foram obtidas nas fases aguda (15º dia) e de recuperação (20º dia) da doença e estimuladas com mielina 10  $\mu$ g/mL de cultura (a) ou (b) estimuladas com ConA 5  $\mu$ g/mL de cultura (b). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e os níveis de IFN- $\gamma$  determinados por ELISA. Os resultados representam a média de 3 animais por grupo  $\pm$  desvio médio.

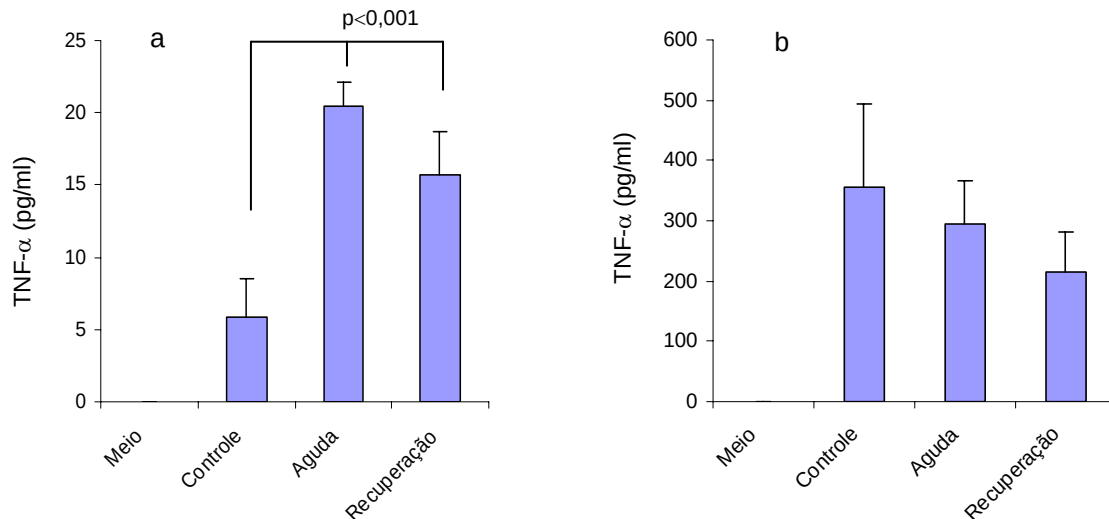
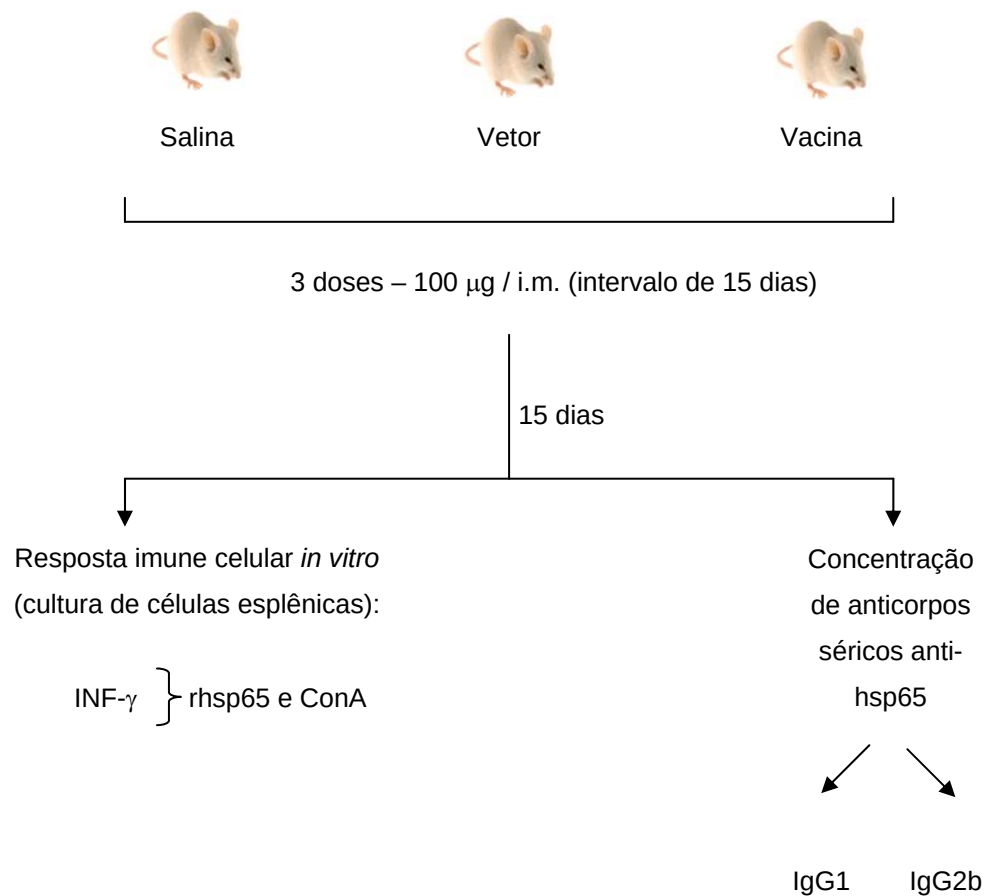


Figura 11 - Produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) por células esplênicas de ratos Lewis com EAE. Células esplênicas foram obtidas nas fases aguda (15º dia) e de recuperação (20º dia) da doença e estimuladas com mielina 10  $\mu$ g/mL de cultura (a) ou com ConA 5  $\mu$ g/mL de cultura (b). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e os níveis de TNF- $\alpha$  determinados por ELISA. Os resultados representam a média de 3 animais por grupo  $\pm$  desvio médio.

#### 4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV

Objetivo: Avaliar a resposta imune induzida pela vacina (pVAXhsp65) em ratos Lewis.



#### 4.4.1 Resultados Protocolo Experimental IV

##### 4.4.1.1 Produção de anticorpos anti-hsp65

Ratos Lewis foram imunizados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias / 100 µg cada / via i.m.). Quinze dias após a última dose, os animais foram sacrificados, amostras de soro foram coletadas e os níveis de anticorpos anti-hsp65 (IgG1 e IgG2b) foram determinados, após diluição 1/10. Como podemos observar na figura 12, não ocorreu produção significativa de IgG1 (a) e IgG2b (b) após este esquema vacinal.

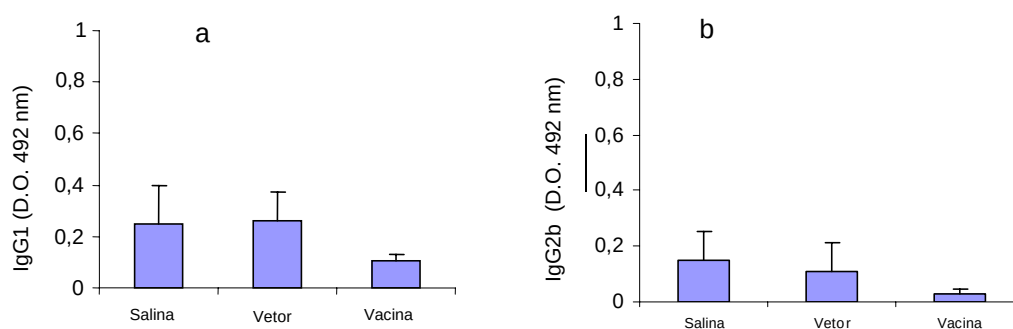


Figura 12 – Produção de anticorpos IgG1 (a) e IgG2b (b) em ratos Lewis imunizados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias / 100 µg cada / via i.m.). As amostras de soro foram coletadas duas semanas após a última dose da vacina e testadas após diluição 1/10. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio médio de 4 animais.

#### 4.4.1.2 Produção de IFN- $\gamma$

Ratos Lewis foram imunizados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias / 100  $\mu$ g cada / via i.m.). Quinze dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e a produção de IFN- $\gamma$  por células esplênicas foi testada por estimulação *in vitro* com rhsp65 e ConA. Os resultados observados são mostrados nas figuras 13 a (estímulo com rhsp65) e 13 b (estímulo com ConA). Níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  foram produzidos nas culturas de animais vacinados, em comparação com animais que receberam vetor ou salina. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os níveis de IFN- $\gamma$  induzidos por ConA foram elevados e similares, como esperado, nos três grupos experimentais.

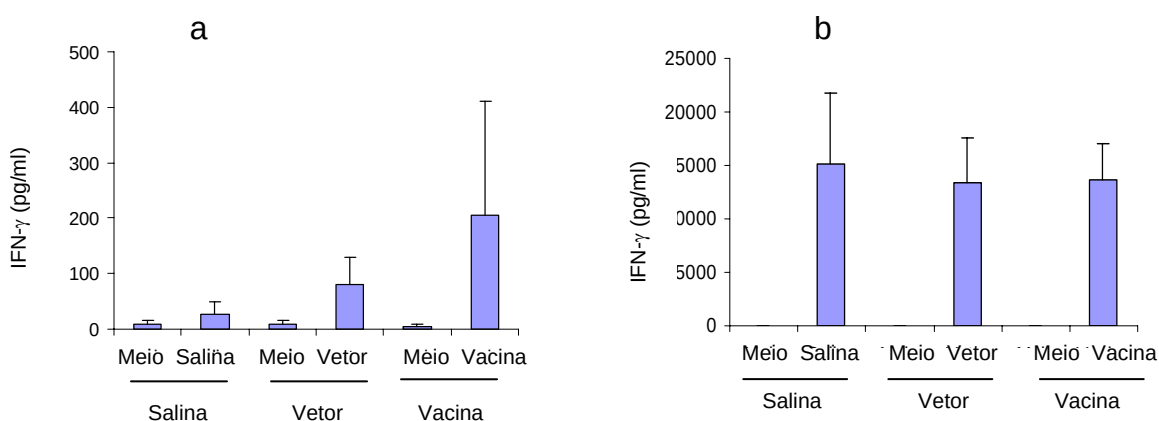


Figura 13 - Produção de IFN- $\gamma$  por células esplênicas de ratos Lewis imunizados com pVAXhsp65 (3 doses com intervalo de 15 dias / 100  $\mu$ g cada / via i.m.) Células esplênicas foram obtidas 15 dias após a última dose da vacina e as culturas estimuladas com rhsp65 (a) e ConA (b). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e a concentração de IFN- $\gamma$  foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio médio de 8 animais.

#### 4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL V

Objetivo: Avaliar o possível efeito imunomodulador da vacina pVAXhsp65 nas características clínicas e imunológicas da EAE em ratos Lewis.



3 doses de 100  $\mu$ g/im (intervalo 15 dias)  
15 dias após última dose

Mielina + ACF



Salina

Salina

Vetor