

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**Proposição de estratégias para controle profilático e
terapêutico da encefalite autoimune experimental baseadas no
efeito imunorregulador da hsp65**

Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Zorzella-Pezavento, Sofia Fernanda Gonçalves.

Proposição de estratégias para controle profilático e terapêutico da encefalite autoimune experimental baseadas no efeito imunorregulador da hsp65 / Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Capes: 21102007

1. Imunologia. 2. Vacinas. 3. Encefalite – Tratamento. 4. Cérebro – Doenças – Tratamento.

Palavras-chave: Células T reguladoras; Encefalite autoimune experimental; Hsp65; IL-17; Vacina gênica.

O sonho

*Sonhe com aquilo 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.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais 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 passaram por suas vidas.*

Clarice Lispector

Dedicatória

Dedico este trabalho,

*Ao meu marido **Rodrigo**, companheiro de metade da minha vida, pelo carinho, compreensão e incentivo. Fico feliz em te ter ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida. Você me fortalece para que eu consiga conquistar meus sonhos e me traz tranquilidade para enfrentar as dificuldades. Amo você...*

*Aos meus pais, **Antonio e Miriam**, pelo amor, dedicação e estímulo. Desde o meu ingresso à universidade, foram meus grandes incentivadores. Agradeço pela minha vida e por sempre estarem ao meu lado.*

Agradecimentos

Agradeço especialmente,

À minha orientadora Alexandrina Sartori, pela confiança, dedicação e disponibilidade que possibilitou a concretização desse trabalho. Desde a minha Iniciação Científica, você me orienta com muita determinação, competência e empolgação, qualidades que me estimularam a seguir a carreira acadêmica. Você contribuiu de forma imensurável para o meu amadurecimento científico e profissional.

Enfim, agradeço por esses oito anos em que trabalhamos juntas e por me incentivar a querer sempre mais.

Muito Obrigada!

Agradeço,

Primeiramente a Deus, pois sem as suas bênçãos não conseguiria concretizar mais esse sonho.

Aos meus companheiros de pesquisa e amigos Fernanda, Thaís, Larissa, Larissa (Akú), Priscila, Bianca e Raphael pelo auxílio fundamental na execução desse trabalho, pela troca de conhecimentos e pelos momentos descontraídos, que minimizam as dificuldades. Trabalhar com vocês possibilitou superar os momentos mais cansativos. Vocês sempre ocuparão um lugar especial em meu coração. Tenho muito orgulho de dizer que somos uma verdadeira equipe. Obrigada!!!

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

Aos professores e alunos do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela grandiosa contribuição para a minha formação profissional e por tornarem o nosso ambiente de trabalho um lugar agradável.

Aos professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem pelo apoio e pelo conhecimento compartilhado.

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

Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno e à Dra. Doralina Guimarães Brum Souza pela contribuição durante meu exame de Qualificação.

À equipe pertencente ao Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT – FMRP – USP), em nome do Prof. Dr. Célio Lopes Silva e da química Ana Paula Masson, pelo fornecimento da vacina gênica pVAXhsp65 e pela confiança depositada em nosso trabalho.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Dr. Amaral Carvalho em Jaú, em nome da Dra. Maura Rosane Valerio Ikoma e da bióloga Camila Marques, pela prontidão em realizar as análises de citometria de fluxo.

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

Aos funcionários da biblioteca da UNESP de Botucatu, especialmente à Rosemeire pela elaboração da ficha catalográfica.

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu amadurecimento profissional.

Muito obrigada!!!

Resumo

RESUMO

Este projeto foi baseado na propriedade imunorreguladora da hsp65 micobacteriana. A proposta geral foi avaliar se a vacina gênica contendo o gene da hsp65 do *Mycobacterium leprae* (pVAXhsp65) pode ser utilizada como estratégia profilática ou terapêutica na encefalite autoimune experimental (EAE). Na primeira etapa desta investigação constatamos que camundongos previamente imunizados com pVAXhsp65 perderam menos peso e apresentaram sintomatologia clínica mais branda. Essa melhora clínica esteve associada com redução da produção de IL-10 por células esplênicas estimuladas *in vitro* com MOG ou ConA. A análise histopatológica revelou redução do processo inflamatório na medula lombar dos animais previamente vacinados em comparação com o grupo controle EAE. Na segunda etapa avaliamos o efeito terapêutico de 4 doses de pVAXhsp65 no desenvolvimento da EAE. A vacina foi capaz de induzir resposta imune específica para hsp65 em camundongos com EAE, o que foi constatado pela produção de IFN- γ e IL-10. Além disso, a terapia modulou a imunidade específica para MOG reduzindo a produção de IFN- γ , IL-6 e IL-17 por células esplênicas. Essa modulação não foi, entretanto, capaz de alterar o decurso clínico da doença. O processo inflamatório no sistema nervoso central (SNC) e a frequência de células T reguladoras (Tregs) na periferia e no SNC também não foram alterados pelo tratamento. Na última etapa desse projeto avaliamos mais detalhadamente a participação da IL-17 no decurso clínico da EAE. Na fase aguda (19^o dia) foram observados perda acentuada de peso e elevado escore clínico (média de 2,75) enquanto que na fase crônica os animais recuperaram o peso perdido e o escore clínico se estabilizou em torno de 1,5. A produção de citocinas por

órgãos linfoides secundários caracterizou-se por níveis elevados de IFN- γ na fase aguda e de IL-17 na fase crônica. Já os linfócitos infiltrantes do SNC estimulados *in vitro* com MOG produziram níveis similares de IFN- γ enquanto que a IL-17 foi produzida apenas na fase aguda da EAE. A porcentagem de células Treg Foxp3⁺ e a intensidade de inflamação local foram similares nas duas fases da EAE. Os dados obtidos mostraram que a vacina pVAXhsp65 exerceu efeito profilático mas não terapêutico na EAE. Apesar da ineficácia clínica, o esquema terapêutico determinou queda na produção de citocinas encefalitogênicas. Além disto, evidenciamos que a inflamação no SNC durante a fase crônica da doença ocorreu na presença de células Treg Foxp3⁺ e na ausência de produção local de IL-17.

Palavras-chave: encefalite autoimune experimental; hsp65; vacina gênica; IL-17; células T reguladoras

Abstract

ABSTRACT

This project was mainly based on the immunoregulatory property of the mycobacterial hsp65. The proposal of this work was to evaluate if a DNA vaccine containing the hsp65 mycobacterial gene (pVAXhsp65) could be used as a prophylactic or therapeutic strategy to control experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) development. In the first part of this investigation we demonstrated that mice previously vaccinated with pVAXhsp65 lost less body weight and presented lower clinical score. Clinical improvement was associated with lower production of IL-10 by spleen cell cultures stimulated with MOG or ConA. Comparative histopathological analysis revealed less inflammatory process in the lumbar spinal cord of previously vaccinated mice in comparison to EAE control group. The second approach was designed to evaluate the possible therapeutic effect of pVAXhsp65 on EAE development. Even though this vaccine was immunogenic for mice with EAE and also able to downmodulate the induction of cytokines by MOG, it was not able to decrease the clinical severity of the disease. Vaccination did not decrease intensity of the inflammatory process neither the frequency of regulatory T cells (Tregs) in the central nervous system (CNS). Finally, we investigated the contribution of the peripheral and local IL-17 production to acute and chronic EAE stages. Mice submitted to EAE induction presented an initial acute phase characterized by accentuated weight loss and high clinical score, followed by a partial recovery when the animals reached normal body weight and smaller clinical scores. Spleen cells stimulated with MOG produced significantly higher levels of IFN- γ during the acute period whereas similar IL-17 levels were produced during both

disease stages. CNS infiltrating cells stimulated with MOG produced similar amounts of IFN- γ but IL-17 was produced only at the acute phase of EAE. The percentage of Foxp3⁺ Treg cells, at the spleen and the CNS, was elevated during both phases. The degree of inflammation was similar at both disease stages. Partial clinical recovery observed during chronic EAE was associated with no IL-17 production and presence of Foxp3⁺ Treg cells in the CNS. These results demonstrated that this pVAXhsp65 immunization protocol had a prophylactic but not therapeutic effect on EAE development. Despite this inefficient clinical improvement, therapeutic protocol showed decreased production of encephalitogenic cytokines. We also observed that inflammation during the chronic stage was concomitant with the presence of Foxp3⁺ Treg cells but absence of local IL-17 production.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis; hsp65; DNA vaccine; IL-17; regulatory T cells

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) que é descrita como a principal causa de incapacidade neurológica em adultos jovens (Hohlfeld, 2009). A doença afeta 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo maior prevalência na Europa e na América do Norte. Além disso, a EM acomete mais mulheres do que homens, na razão 2:1 (WHO, 2006). A maioria dos pacientes apresenta inicialmente um quadro transitório de sintomas com períodos de exacerbação e remissão da doença, seguido por fase secundária progressiva, caracterizada por perdas irreversíveis e neurodegeneração (Imitola et al., 2005; Hohlfeld, 2009). As primeiras manifestações clínicas da EM incluem fraqueza de um ou mais membros, perda da visão, falta de coordenação motora e parestesia (Silberberg, 1992).

A EM pode ser classificada em vários subtipos de acordo com o decurso clínico da doença: EM caracterizada por recidivas e remissões, na qual os surtos são seguidos por períodos de remissão sem progressão clínica da doença; progressão secundária, cujos surtos se caracterizam por uma deterioração neurológica gradual e são seguidos de períodos de remissão; progressão primária, presente em 15% dos pacientes com EM caracterizada por dano neurológico gradual presente desde o aparecimento da doença e frequentemente por ausência de surtos. Raramente, nesses casos de progressão primária, podem ocorrer pequenas exacerbações no decurso gradual da doença denominadas recidivas progressivas da EM (Lublin and Reingold, 1996).

Para o diagnóstico da EM era necessário, inicialmente, a presença de dois ou mais surtos desmielinizantes e a evidência clínica do comprometimento de duas ou mais regiões do SNC (Poser et al., 1983). Com o advento da ressonância magnética foi possível um diagnóstico mais precoce, visualizando as pequenas placas e ainda possibilitando avaliar a evolução clínica da doença e o efeito do tratamento (McDonald et al., 2001). O tratamento da EM é realizado com medicamentos que visam reduzir a frequência e a gravidade das exacerbações, uma vez que não há cura para a doença. Os corticosteróides, como a metilprednisolona, são utilizados na fase aguda da doença. Já as drogas imunomoduladoras, como o IFN- β e o acetato de glatiramer, são utilizadas em pacientes com quadros de exacerbação e remissão da doença (Rudick, 2005; Gold & Wolinsky, 2011). Esses dois medicamentos impedem a ativação, a proliferação e a migração de células inflamatórias para o SNC (Gold & Wolinsky, 2011). Pacientes que não respondem bem a essa primeira linha de tratamento são submetidos ao uso do natalizumabe, um anticorpo monoclonal que se liga a cadeia $\alpha 4$ da integrina VLA-4, inibindo a adesão entre linfócitos e células endoteliais dos vasos sanguíneos no SNC, reduzindo assim o tráfico de linfócitos através da barreira hemato-encefálica (Polman et al, 2006).

Causa e patogênese da EM não são completamente conhecidas, mas ainda se acredita que esta seja, fundamentalmente, uma doença autoimune mediada por células Th1 com especificidade para antígenos do SNC, tendo as citocinas como TNF- α , IFN- γ e a emergente IL-17, um papel importante no processo inflamatório e consequente degeneração axonal, morte dos oligodendrócitos e disfunção neuronal (Steinman 1996; Lucchinetti et al., 2000; Elloso et al., 2005; Sospedra & Martin, 2005; Furuzawa-Carballeda et al.,

2007). As principais características histopatológicas da EM são: presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos T e B e macrófagos; desmielinização, ocasionada pela destruição da bainha de mielina ou pela morte do oligodendrócito, célula responsável pela produção de mielina; dano ou perda dos axônios; além da gliose, que se caracteriza por aumento do número de células da glia na substância branca em resposta ao dano no SNC (Constantinescu et al., 2011).

A exata causa da EM permanece desconhecida, embora haja evidências de que fatores genéticos e ambientais contribuam para o desenvolvimento da doença. Evidências epidemiológicas revelam o papel de patógenos, como as infecções virais, com potencial indutor de EM. Os patógenos podem induzir autoimunidade através do mecanismo denominado mimetismo antigênico, que ocorre quando as células T específicas para peptídeos derivados de patógenos possuem reatividade cruzada com auto-antígenos (Chastain and Miller, 2012).

A imunopatogênese da EM também tem sido atribuída a defeitos na atividade funcional de células T reguladoras (CD4+CD25+). Essas células são importantes não apenas para a manutenção da tolerância periférica, mas também para controlar a autoimunidade órgão-específica através da supressão de células T autorreativas (Sakaguchi et al., 1995; Tang et al., 2004). Apesar de alguns trabalhos mostrarem níveis normais dessas células em pacientes com EM (Viglietta et al., 2004; Haas et al., 2005; Venken et al., 2006) tem sido descrita redução na atividade funcional das mesmas *in vitro* (Haas et al., 2005; Huan et al., 2005).

1.2 – Encefalite autoimune experimental

A encefalite autoimune experimental (EAE) é uma doença desmielinizante do SNC cujas características clínicas e histológicas se assemelham a EM, sendo utilizada como modelo experimental para o estudo da doença humana. Esta doença é induzida principalmente em camundongos e ratos através da imunização com antígenos derivados de mielina (*myelin basic protein* – MBP, *proteolipid protein* – PLP, *myelin oligodendrocyte glycoprotein* – MOG ou peptídeos derivados destas proteínas) em associação com o adjuvante completo de Freund (ACF).

A EAE é mediada por células T específicas para mielina, que são ativadas na periferia e migram para o SNC após a permeabilização da barreira hematoencefálica. No SNC estes linfócitos T são reativados por contato com as células apresentadoras de antígenos (APCs) presentes no local, resultando em processo inflamatório, desmielinização e dano axonal. Dependendo do protocolo de imunização e das características genéticas da cepa de camundongo utilizada, a EAE pode ser caracterizada por uma doença aguda monofásica, crônica progressiva ou por um decurso clínico composto por recidivas e remissões (Fletcher et al., 2010). A transferência adotiva de células T específicas para mielina também desencadeia a doença, indicando que a EAE é uma doença autoimune mediada pela resposta imune celular (Link & Xiao, 2001).

Um possível comprometimento da atividade das células T reguladoras (Tregs) na EM tem sido sugerido por estudos utilizando modelos animais. Por exemplo, a presença dessas células é observada no SNC na fase de recuperação da EAE. Por outro lado, a depleção de células T reguladoras, que expressam o fator de transcrição Foxp3 (*forkhead transcription factor 3*),

exacerba as manifestações clínicas da doença (McGeachy et al., 2005). Esses achados ressaltam a importância da atividade supressora dessas células na inflamação do SNC.

Os primeiros sintomas clínicos da doença são geralmente observados dentro de 9 a 12 dias após a indução, no entanto, o decurso clínico subsequente depende da espécie que está sendo estudada e do tipo de imunização (Gold et al., 2006). Por exemplo, a MBP induz uma doença aguda autolimitada em cobaias, enquanto que a imunização com homogenato do tecido do SNC resulta numa doença crônica com recidivas e remissões (Raine et al., 1977; Alvord et al., 1985). Já no rato Lewis, a EAE é caracterizada como uma doença aguda, grave e monofásica com recuperação espontânea. Esta recuperação é associada com o desenvolvimento de células T com atividade supressora (Varriale et al., 1994). Neste modelo, os animais apresentam infiltração de células T no SNC, acompanhada de ativação da microglia (Namer et al., 1998). As características histopatológicas da EAE no rato Lewis incluem infiltração mononuclear meníngea, perivascular e parenquimal no SNC, com desmielinização reduzida ou até mesmo ausente (Link & Xiao, 2001). A grande vantagem deste modelo é que o desenvolvimento da doença ocorre em quase 100% dos animais. (Swanborg, 2001). Por outro lado, a doença desencadeada em modelos murinos de EAE, empregando diferentes cepas de camundongos isogênicos, mimetiza melhor o decurso crônico e/ou de exacerbação-remissão que é o mais comum na EM (Gold et al., 2006). Por exemplo, a imunização de camundongos C57BL/6 com o peptídeo (35-55) derivado de MOG desencadeia uma doença neurológica caracterizada por paralisia e também um extenso processo de desmielinização. Os animais desenvolvem doença crônica após a

imunização que perdura por, pelo menos, 45 dias (Bernard et al., 1997). As lesões são caracterizadas por áreas confluentes de infiltrado inflamatório mononuclear, composto principalmente por macrófagos e linfócitos T CD4+ e desmielinização na substância branca periférica (Day, 2005). Outro modelo de EAE frequentemente empregado é o camundongo SJL/J imunizado com o antígeno PLP (139-151), o qual se caracteriza por um quadro de recidivas e remissões da doença. Lesões típicas ocorrem no nervo óptico, medula espinhal, cerebelo e córtex cerebral, inicialmente com a presença de um infiltrado perivascular e meningeal composto por linfócitos e neutrófilos. No decorrer da doença, segue uma resolução do infiltrado inflamatório concomitante com o dano na substância branca e gliose, desmielinização axonal e presença de macrófagos com *debris* resultantes da degradação da mielina (McRae et al., 1995; Vanderlugt et al., 2000).

Diversos estudos têm mostrado que modelos experimentais de EAE em roedores reproduzem as lesões de perfil inflamatório no SNC características da EM em humanos. Essas lesões na EAE também são decorrentes de desmielinização, dano axonal e gliose. Desta forma o uso de modelos experimentais empregando ratos e camundongos é amplamente empregado em estudos de imunopatogênese e desenvolvimento de novas terapias ('t Hart et al., 2011).

1.3 – Imunopatogênese da EM e EAE

A EAE tem sido classicamente considerada uma doença Th1 não só porque clones Th1 específicos para mielina transferem adotivamente a doença, mas

também porque tem sido demonstrado que citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α danificam a bainha de mielina (Klinkert et al., 1997). O papel patogênico das células Th1 na EAE foi comprovado pela observação de que camundongos knockout para IL-12p40 eram resistentes à indução da EAE. Como a IL-12 é necessária na diferenciação do padrão Th1, esses camundongos não produziam citocinas desse perfil, como IFN- γ . Além disso, pacientes com EM que foram tratados com IFN- γ apresentaram piora no quadro clínico (Panitch et al., 1987). Em camundongos, altos níveis de IFN- γ são detectados no CNS durante a fase aguda da EAE, havendo um declínio na fase de recuperação, o que comprova a participação dessa citocina na patogênese dessa doença. No entanto, camundongos deficientes em IFN- γ são susceptíveis a indução da EAE (Ferber et al., 1996; Willenborg et al., 1996), eliminando essa citocina como único fator patogênico envolvido no desenvolvimento dessa doença autoimune do SNC.

Mais recentemente, ficou demonstrado que outros tipos de células T efectoras tais como Tc e Th17 também podem contribuir para o desenvolvimento desta patologia. Células Th17 têm sido consideradas indutoras potentes de autoimunidade (Langrish et al., 2005). A expressão de IL-17 tem sido associada com diversas doenças autoimunes como artrite reumatóide, EM, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (Matusevicius et al., 1999; Kolls & Lindén, 2004). Diversos estudos indicam que a IL-17 tem um papel relevante na EM. Por exemplo, foi demonstrado que a IL-17 está presente em grande quantidade nas lesões do SNC de pacientes com esta patologia (Lock et al., 2002). Além disso, pesquisadores constataram concentrações significativamente mais elevadas de IL-17 no fluido cerebrospinal de pacientes com EM quando comparadas com amostras obtidas de indivíduos saudáveis (Ishizu et al., 2005). Por outro lado, animais deficientes em

IL-17 desenvolvem EAE mais tardiamente e com sintomatologia mais branda (Komiyama et al., 2006). Além disso, tem sido constatado que infiltração de células T e inflamação no SNC de animais com EAE só ocorre se houver uma maior proporção de células Th17 do que de células Th1. A observação de que células Th17 específicas para mielina podem determinar o desenvolvimento de EAE por transferência adotiva de células comprovam o papel da Th17 na EAE (Awasthi et al., 2008). Portanto, estes resultados sugerem que a IL-17 é uma citocina efetora que acarreta dano tecidual e promove a imunopatologia da EAE. A principal função da IL-17 na imunopatogênese da EAE é a sua capacidade de interferir na barreira hemato-encefálica. A IL-17 aumenta a atividade da metalloproteinase-3 (MMP-3) e atrai neutrófilos para o local da inflamação. A ativação de enzimas mediadas por neutrófilos como MMPs, proteases e gelatinases participa do aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica. Essa maior permeabilidade facilita o recrutamento de monócitos e macrófagos para o SNC, acarretando dano neurológico e destruição da bainha de mielina (Yong et al., 2001; Park et al., 2005, Vojdani & Lambert, 2011). Recentemente, Huppert e colaboradores em 2010 demonstraram o mecanismo celular envolvido no dano à barreira hemato-encefálica. A IL-17 estimula a produção de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais do cérebro. O estresse oxidativo ativa o maquinário de contração endotelial, que é responsável pela perda e desorganização das proteínas de junção, acarretando uma maior permeabilidade da barreira hemato-encefálica. Além disso, as espécies reativas de oxigênio aumentam a expressão de moléculas de adesão endoteliais resultando numa maior migração de células inflamatórias pela barreira hemato-encefálica.

Ainda não se sabe qual subtipo de linfócito T CD4 é mais importante na patogênese da EAE, visto que tanto camundongos deficientes em ROR γ t como em T-bet são resistentes à indução da EAE, confirmando que tanto linfócitos Th17 quanto Th1 estão envolvidos no processo de desmielinização do SNC (Bettelli et al., 2004; Ivanov et al., 2006). Além disso, pesquisadores caracterizaram o fenótipo das células T infiltrantes no SNC de animais com EAE e verificaram a presença tanto de células Th1 quanto Th17 (Langrish et al., 2005; Korn et al., 2007). No entanto, a proporção de cada subpopulação varia de acordo com as diferentes cepas de camundongos utilizadas. Em camundongos C57BL/6 ocorreu predomínio de linfócitos Th1 no CNS durante o pico da doença, já no SJL detectou-se um maior número de Th17. Outro relato que corrobora a contribuição das duas citocinas na patogênese da EAE é o de que a transferência adotiva de células Th1 ou Th17 específicas para mielina são capazes de induzir EAE, embora haja diferenças na localização das lesões no SNC e no decurso clínico da doença (Stromnes et al., 2008). A transferência de linfócitos Th17 induz EAE atípica com presença de infiltrado inflamatório principalmente no cérebro, enquanto que as células Th1 acarretam um desenvolvimento típico da EAE com inflamação apenas na medula espinhal. Embora ambas as citocinas estejam elevadas no início do desenvolvimento da EM, foi descrito que apenas o aumento do IFN- γ esteve associado com recidiva da doença (Frisullo et al., 2008). Além disto, em estudo recente foram identificadas células T co-expressando IL-17 e IFN- γ no cérebro de pacientes com EM, sugerindo que células T IL-17 +IFN- γ + podem estar envolvidas na patogênese da EM (Kebir et al., 2009).

O que dificulta ainda mais a distinção do papel imunopatogênico do IFN- γ e da IL-17 na EAE é a plasticidade do fenótipo Th17. As células Th1 são

relativamente estáveis e não são facilmente reprogramadas enquanto as células Th2 podem alterar a sua configuração para um fenótipo Th1 dependendo do microambiente (Lee et al., 2009). As células Th17 também parecem ser pouco estáveis, ou seja, tanto em condições de homeostasia quanto na presença de processos inflamatórios, estas células T podem co-expressar IFN- γ e IL-17 ou expressar apenas IFN- γ (Ivanov, et al., 2006; Acosta-Rodrigues et al., 2007; Suryani & Sutton, 2007; Korn et al., 2008). Células que secretam ambas as citocinas são frequentemente detectadas no SNC de camundongos com EAE (Suryani & Sutton, 2007; Korn et al., 2008; Abromson-Leeman et al., 2009). Pesquisas recentes sugerem que a presença das citocinas IL-2 e IL-4 determinam a conversão do perfil Th17 para Th1 e Th2 respectivamente (Lexberg et al., 2008; Lee et al., 2009). A presença de TGF- β também parece ser crucial na manutenção da expressão de IL-17 e na prevenção da produção de IFN- γ por linfócitos Th17. Na ausência de TGF- β , IL-12 e IL-23 estimulam as células Th17 a produzirem IFN- γ (Lee et al., 2009).

É possível que o desenvolvimento da EM esteja relacionado com defeitos na atividade funcional de células T reguladoras. Em 1995, Sakaguchi e colaboradores, descreveram uma subpopulação de células T CD4⁺ que expressavam também a proteína de superfície CD25 (cadeia α do receptor para a IL-2). Essas células apresentavam uma importante atividade regulatória e eram capazes de controlar as células T autorreativas *in vivo*. A partir deste período, estas células foram renomeadas e passaram a ser chamadas de células T reguladoras. As células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ representam aproximadamente 5-10% dos linfócitos T CD4⁺ periféricos de humanos e de camundongos e podem atuar tanto no controle da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa (Shevach, 2002).

Embora o marcador CD25 seja muito utilizado para análise de células T CD4⁺ reguladoras, é importante lembrar que todas as células T ativadas também expressam essa proteína de superfície. As células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ também expressam o gene regulador Foxp3, que codifica o fator de transcrição Foxp3, que é fundamental para o desenvolvimento e função desta linhagem (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). O Foxp3 regula a transcrição de genes que codificam algumas proteínas, como por exemplo, CTLA-4 e CD39 (Ozdemir et al., 2009). A constatação de que camundongos e humanos com mutações no gene Foxp3 desenvolvem uma doença autoimune linfoproliferativa grave (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001) ressalta a importância desse fator como fundamental no desenvolvimento destas células. Atualmente, o Foxp3 é considerado o melhor marcador para células T reguladoras de camundongos atualmente.

As células T reguladoras são classificadas como naturais ou adaptativas. As células T reguladoras naturais (células TC4⁺CD25⁺Foxp3⁺) são originadas no timo, enquanto as induzidas são geradas na periferia. A conversão de células TCD4⁺ naíve em células TCD4⁺Foxp3⁺ que ocorre na periferia requer contato com o antígeno (Mucida et al., 2009). As células T reguladoras induzidas são divididas em dois grupos: as Tr1, produtoras de IL-10 e as Th3, produtoras de TGF- β . Segundo Workman e colaboradores em 2009, a expressão de Foxp3 é observada nas células Th3, mas não nas células Tr1, no entanto outros pesquisadores afirmam que as células reguladoras Th3 e Tr1 não expressam Foxp3 (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009). Portanto ainda é controverso se há expressão de Foxp3 nas células T reguladoras induzidas.

Os mecanismos de supressão empregados pelas células T reguladoras podem ser divididos em quatro tipos distintos (Vignali et al., 2008; Workman et al.,

2009). O primeiro é a supressão mediada por citocinas inibitórias, como IL-10, TGF- β e IL-35. O segundo é supressão mediada por citólise. A lise mediada por células T reguladoras é dependente de granzima A e perforina nos humanos e de granzima B em camundongos. O terceiro mecanismo é a supressão por distúrbio metabólico. Além de sofrer apoptose pela privação de IL-2, as células T reguladoras também expressam altos níveis de CD39 e CD73, que liberam adenosina na região pericelular. Essa molécula atua nas células T efetoras por meio do receptor de adenosina 2A, determinando uma alteração metabólica que inibe a função dessas células. O último mecanismo tem como alvo de ação as células dendríticas (DC). Neste caso, as células T reguladoras induzem a produção de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas DC. Esta enzima causa imunossupressão por determinar degradação de triptofano e produção de metabólitos pró-apoptóticos. Esse mecanismo depende ainda da interação de CTLA-4 com CD80/CD86 presentes nas células T reguladoras e DC, respectivamente. Além disso, a maturação das DC pode ser suprimida pela interação entre LAG3 (presente nas células T reguladoras) com o MHC de classe II.

Não há dúvida de que os diversos tipos de Tregs possuem papel importante na manutenção da homeostasia e que tanto as células Tregs naturais quanto às adaptativas têm capacidade de regular o processo inflamatório na EM e na EAE. As células T autorreativas específicas para antígenos de mielina estão presentes em indivíduos saudáveis, mas sua atividade está inibida por mecanismos imunorreguladores. Já na EM essas células T autorreativas conseguem driblar esses mecanismos reguladores. Sustentando essa hipótese, pesquisadores demonstraram que pacientes com EM apresentam uma redução das células Tr1, concomitante com queda nos níveis de IL-10 (Astier et al., 2006; Martinez-Forero et

al., 2008). Apesar de haver relatos na literatura sobre a redução da frequência de Tregs naturais em pacientes com EM (Venken et al., 2008), a maioria dos estudos mostra frequência similar aos observados em indivíduos normais (Haas et al., 2005; Feger et al., 2007). Apesar de não haver déficit numérico de células Treg em pacientes com EM, ensaios *in vitro* evidenciaram queda da atividade supressora de Tregs obtidas de pacientes com EM (Viglieta et al., 2004; Huan et al., 2005; Frisullo et al., 2009). A atividade supressora foi restaurada após terapia com IFN- β (de Andrés et al., 2007), acetato de glatiramer (Hong et al., 2005) ou esteroides (Xu et al., 2009).

Já em modelos experimentais, pesquisadores demonstraram que na EAE induzida por MOG, a transferência de células T CD4⁺ CD25⁺ reduziu a gravidade da doença e essas células ainda foram capazes de suprimir as células específicas para MOG *in vitro* (Kohm et al., 2002). Esse efeito regulador é mediado por IL-10, visto que em animais knockout para IL-10 a transferência de Tregs não conferiu proteção na EAE (Zhang et al., 2004). Quando se avalia o decurso clínico natural da EAE, as Tregs são fundamentais para o processo de recuperação da EAE. As Tregs se acumulam no CNS durante a fase de recuperação (McGeachy et al., 2005; Liu et al., 2006; Korn et al., 2007) e a sua depleção inibe a recuperação dos animais (McGeachy et al., 2005). A fase de recuperação da EAE tem sido associada à indução de TGF- β (Zhang et al., 2006) e IL-10 (McGeachy et al., 2005), sendo que essas citocinas podem ser produzidas tanto por células Treg naturais quanto por células do perfil Tr1. Outro dado interessante é o de Korn e colaboradores, em 2007, que demonstraram que embora haja Tregs no SNC durante o pico da EAE, essas células são incapazes de suprimir totalmente as células T efetoras presentes no SNC. Esses estudos sugerem que a autoimunidade depende de um balanço

delicado entre as respostas de perfil regulador e inflamatório, portanto durante o início do desenvolvimento dos sintomas há um predomínio da resposta inflamatória, enquanto que há um aumento das células Treg durante a resolução da doença. Vale a pena ressaltar que essas células Treg derivadas do SNC são capazes de suprimir a produção de IFN- γ induzida especificamente por MOG, mas não IL-17, sugerindo que as células Th17 são mais resistentes a supressão (O'Connor et al., 2007).

O papel das células B e dos anticorpos específicos para mielina nas lesões da bainha de mielina é ainda controverso. Existem dados sugerindo sua contribuição na EM, entretanto, os resultados observados em modelos animais também não são claros. Por exemplo, camundongos deficientes em células B não desenvolvem EAE quando imunizados com MOG (Lyons et al., 1999), ou desenvolvem uma doença com menor gravidade (Svensson et al., 2002). Além disto, camundongos transgênicos produtores de elevados níveis de anticorpos anti-MOG desenvolvem EAE mais grave e de início mais precoce em comparação com animais selvagens (Litzenburguer et al., 1998). Por outro lado, Sekiguchi et al., 2008, mostraram que anticorpos anti-MOG não estão envolvidos na gravidade da EAE crônica não remitente.

1.4 – Proteína de choque térmico 65kDa (hsp65)

As proteínas de choque térmico (hsps) foram originalmente identificadas como um grupo de proteínas induzidas em situações de estresse, como alterações de temperatura, deficiência nutricional, exposição a mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IFN- γ , estresse oxidativo e exposição a radicais livres e infecções (van Eden et al., 2005). Fisiologicamente, as hsps funcionam

como chaperonas, interagem com proteínas do citoesqueleto, auxiliando no transporte de proteínas dentro do compartimento celular, no controle e sinalização do ciclo celular e também na proteção contra apoptose. Recentemente, tem sido ressaltado o papel das hsps na apresentação antigênica devido às suas funções de chaperonas. Estas moléculas auxiliam no transporte de peptídeos antigênicos para posterior associação com as moléculas de MHC de classe I e II, indispensáveis para apresentação antigênica para as células T (Li & Srivastava, 2004).

As hsps são classificadas em várias famílias nomeadas de acordo com o peso molecular: hsps de baixo peso molecular, hsp40, hsp60, hsp70, hsp90 e hsps de alto peso molecular. Essas proteínas foram identificadas em procariotos, eucariotos e plantas em vários compartimentos celulares como citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplasto (Lindquist, 1986). As famílias de hsps são altamente conservadas evolutivamente. Sendo assim, algumas hsps encontradas em mamíferos possuem alta homologia com proteínas de origem microbiana, o que resulta num processo chamado mimetismo antigênico, pois há reconhecimento imunológico cruzado (van Eden et al., 2005). A família da hsp65 é uma das mais conservadas filogeneticamente, possuindo mais de 97% de homologia entre as hsp65s provenientes de organismos procariotos e de 70% de homologia entre a de origem procariótica e a hsp65 humana (Kaufmann et al., 1991).

Acredita-se que o significado fisiológico deste reconhecimento cruzado de hsps próprias esteja relacionado com o desenvolvimento de processos inflamatórios. A primeira evidência do papel das hsps como antígenos-alvo em

processos inflamatórios foi obtida em um modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos (van Eden et al., 1988). Esses pesquisadores demonstraram que células T isoladas desses animais eram específicas para hsp60. Desde então, resposta imune contra hsps tem sido detectada em diversos modelos experimentais de doenças inflamatórias e em patologias humanas decorrentes de processos inflamatórios.

A hsp65 está envolvida na imunopatogênese de várias doenças pró-inflamatórias como artrite, aterosclerose, diabetes e EAE. Há dois mecanismos que tentam explicar esse papel imunopatogênico da hsp65. Primeiramente, as hsps podem ativar a resposta imune inata através da interação com macrófagos e células dendríticas, levando a indução de resposta imune adaptativa anti-hsp65. Além disso, os anticorpos anti-hsp65 podem desencadear papel patogênico através da ativação do sistema complemento. O outro mecanismo está relacionado a maior expressão de hsps endógenas quando as células se encontram em situação de estresse, como um processo inflamatório. Como essas hsps endógenas são moléculas-alvo de linfócitos T e anticorpos induzidos por hsps não próprias, pode ocorrer propagação do processo inflamatório pela atração de linfócitos anti-hsp para o local da inflamação (Rajaiah & Moudgil, 2009).

No entanto, foi constatado um potencial imunorregulador das hsps através de estudos sobre o decurso clínico natural de doenças autoimunes experimentais e humanas e também através de investigações de modulação destas doenças por estratégias terapêuticas (Rajaiah & Moudgil, 2009). Esses estudos demonstraram que células T específicas para hsp possuem habilidade reguladora, indicando que as hsps, principalmente hsp60 e hsp70, são capazes

de suprimir a resposta imune que ocorre em doenças inflamatórias humanas, como artrite reumatoide, diabetes tipo I, aterosclerose, esclerose múltipla e alergia (van Eden et al., 2005). As primeiras evidências desta atividade regulatória são oriundas de modelos de artrite. Após a definição da hsp60 micobacteriana como o antígeno relevante na artrite experimental em ratos (van Eden et al., 1988), várias tentativas de indução desta doença por imunização com hsp60 falharam. Além disso, essas imunizações com hsp60 protegeram os animais contra indução subsequente de 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). 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).

Estas células T reguladoras específicas para hsp microbiana podem ser primadas, ativadas e sofrer expansão clonal pela exposição natural às hsp da microflora intestinal ou durante uma infecção bacteriana. Essa ativação também pode ocorrer de forma artificial através da imunização com hsp. Quando essas células atingem a periferia, ocorrem manutenção e modulação

desse repertório específico para hsp através do contato desses linfócitos T com hsps próprias presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos não profissionais. Devido à ausência de sinais co-estimulatórios, as células T específicas para hsp adquirem perfil regulador. As células T específicas para hsp migram para o sítio inflamatório e exercem o seu efeito regulador quando expostas às hsps próprias principalmente através da produção de IL-10 (van Eden et al., 2005).

Uma das linhas de pesquisa do nosso laboratório é justamente avaliar o papel imunorregulador da hsp65 micobacteriana em doenças autoimunes experimentais. Nesse projeto em especial avaliamos o potencial profilático e terapêutico desta proteína na EAE, que é um modelo de doença autoimune envolvendo o SNC. 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 à 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. Poucos trabalhos têm sugerido que a resposta anti-hsp possa contribuir para reduzir a incidência e gravidade desta doença (Birnbaum et al., 1996; Heneka

et al., 2001). Além disso, Gao e colaboradores em 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).

Levando-se em consideração que o papel regulador da hsp65 na EM não está bem definido, este projeto foi proposto para avaliar o efeito de uma vacina de DNA contendo o gene que codifica a hsp65 micobacteriana no desenvolvimento clínico da EAE.

Esta vacina foi construída pela inserção do gene que codifica a hsp65 do *Mycobacterium leprae* em um vetor plasmideal e foi idealizada, inicialmente, para controle da tuberculose murina experimental. Camundongos BALB/c imunizados, por via intramuscular, com esta vacina gênica apresentaram maior produção de IFN γ 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 específicas para hsp65 nos linfonodos e produção de células de memória (Bonato et al.,1998; Silva et al.,1999). Também foi demonstrado que esta vacina desencadeou resposta imune protetora na tuberculose experimental murina (Lowrie et al.,1999). Este efeito protetor da hsp65 na tuberculose se justifica em função da elevada imunogenicidade desta proteína em várias infecções bacterianas, incluindo aquelas causadas por *Mycobacterium tuberculosis*. Estudos feitos por Kaufmann e colaboradores em 1987, mostram que 1/5 das células específicas para o *M. tuberculosis* são reativas para esta hsp durante a infecção experimental murina.

No decurso destas investigações iniciais foi constatado que a DNAhsp65 também apresentava atividade imunoterapêutica contra a tuberculose experimental já estabelecida. Lowrie e colaboradores, em 1999, descreveram que este efeito terapêutico ia além da doença crônica, pois incluía controle da doença disseminada, tuberculose latente e também da tuberculose resistente a múltiplas drogas. Mais recentemente, este efeito terapêutico foi confirmado utilizando um modelo de infecção intratraqueal por *M. tuberculosis*, o qual mimetiza melhor a infecção natural por esta bactéria. A administração de DNAhsp65 em camundongos previamente infectados determinou um efeito imunorregulador e terapêutico no pulmão, caracterizado por diminuição significativa da carga bacteriana associada com nítida redução de lesão no parênquima pulmonar (Bonato et al., 2004). Só posteriormente, a partir de estudos com modelos experimentais de doenças autoimunes é que se descobriu que este achado se devia, em parte, ao efeito anti-inflamatório da hsp65.

Nosso envolvimento com o uso da DNAhsp65 em autoimunidade derivou, inicialmente, da necessidade de excluirmos um possível efeito deletério autoimune desta construção. Esta possibilidade existia tanto em função da elevada homologia da hsp65 micobacteriana com a hsp correspondente em mamíferos, quanto pela presença de sequências CpG no vetor, as quais poderiam desencadear ou agravar um quadro de autoimunidade. Por esta razão, o efeito da DNAhsp65 foi investigado em modelos experimentais de doenças autoimunes. Camundongos selecionados para elevada resposta inflamatória (AIRmax) desenvolvem artrite quando inoculados com pristane (Vigar et al., 2000). A imunização prévia com DNAhsp65 associada à inoculação de pristane nestes animais determinou efeito protetor contra o desenvolvimento de artrite. Um aspecto importante é que este efeito protetor foi acompanhado de imunorregulação caracterizada por diminuição na produção de IL-12 e aumento concomitante na produção de IL-10 (Santos-Junior et al., 2005). O efeito desta vacina em modelo de diabetes espontâneo (camundongos NOD) foi igualmente protetor, sendo caracterizado por diminuição dos níveis glicêmicos e redução significativa de insulite. Além disto, a análise imunohistoquímica revelou um cenário sugestivo de infiltração de células T reguladoras. Inoculação prévia da vacina determinou redução de TCD4+ e TCD8+ e aparecimento concomitante de TCD25+ no parênquima das ilhotas. Estas alterações foram, sugestivamente, acompanhadas de diminuição nos níveis de TNF- α e aumento nos níveis de IL-10 nas ilhotas (Santos Júnior et al., 2007). Mais recentemente, o nosso grupo avaliou o efeito modulador da DNAhsp65 na EAE em ratos Lewis. A inoculação prévia do vetor ou vacina não afetou os parâmetros clínicos (peso e escore clínico) da EAE em animais

submetidos à indução da doença com mielina. No entanto, ambas as preparações de DNA reduziram significativamente a intensidade do infiltrado inflamatório presente no cérebro. Essa atividade anti-inflamatória foi associada com um efeito imunomodulador caracterizado por redução da produção de IFN- γ e IL-10 por células de órgãos linfoides secundários (Zorzella-Pezavento et al., 2010).

1.5 – Racional do projeto

Dados clássicos da literatura mostram que a hsp65 é capaz de induzir células T reguladoras. Considerando este fato e a experiência prévia de pesquisadores do nosso grupo que demonstraram que esta construção vacinal era capaz de desencadear proteção contra o desenvolvimento de artrite e diabetes experimental, supomos que a mesma poderia ter efeito protetor também sobre processos inflamatórios envolvendo o SNC. Neste contexto, nossa hipótese de trabalho é que a vacina DNAhsp65 possa servir como medida profilática e/ou terapêutica na EAE, que é um modelo experimental de EM.
