

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

RNA mensageiro codificador da proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae* como uma nova estratégia vacinal no combate da tuberculose experimental.

Julio Cesar Cetrulo Lorenzi

Ribeirão Preto, Maio 2008.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Julio Cesar Cetrulo Lorenzi

RNA mensageiro codificador da proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae* como uma nova estratégia vacinal no combate da tuberculose experimental.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo

Ribeirão Preto, Maio 2008.

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE IMUNOTERAPIA GÊNICA,
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, COM O AUXÍLIO
FINANCEIRO DA FAPESP 06/03987-7

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS
DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus administrativo de Ribeirão Preto/USP

Lorenzi, Julio Cesar Cetrulo

RNA mensageiro codificador da proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae* como uma nova estratégia vacinal no combate da tuberculose experimental

Messenger RNA coding for hsp65 protein from Mycobacterium leprae as a new vaccine strategy against experimental tuberculosis

Ribeirão Preto, 2008.

133 pp. 28cm

Dissertação de Mestrado, apresentado a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof. Dra. Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo.

“Não posso imaginar que uma vida sem trabalho seja capaz de trazer qualquer espécie de conforto. A imaginação criadora e o trabalho para mim andam de mãos dadas; não retiro prazer de nenhuma outra coisa.”

Sigmund Freud

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z. O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada.”

Albert Einstein

“Viver é como andar de bicicleta: É preciso estar em constante movimento para manter o equilíbrio.”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Acácio e Helena por terem me ensinado os reais valores da vida.

Ao meu irmão Gustavo por sua amizade.

A minha futura esposa Valéria por seu amor incondicional e sua paciência.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Arlete A. M. Coelho-Castelo por sua garra, competência e por não ter medo e acreditar nas idéias de seus alunos. Por sua confiança ao ter acreditado em meu potencial.

Aos Profs. Dr.Célio Lopes Silva e Dra.Vânia Luiza Deperon Bonato Martins, pelo apoio em todo o decorrer do trabalho.

Aos Profs.Dr.José Marzagão Barbuto e Dario Zambini pela atenção dispensada, comentários e sugestões na correção da proforma desta dissertação, e pela participação na banca.

À Ana Flávia Gembre, Izaira Tincani Brandão e Ana Paula Masson, Lenaldo pelo auxílio técnico e por compartilhar a experiência prática que os livros não trazem.

Aos Profs. Dr.: Angela Cruz, Luiz Tosi, Gustavo Goldman, Constance Oliver, Maria Célia Jamur, por cederem suas infra-estruturas que foram essências para a realização de alguns experimentos.

A toda minha família que sempre me incentivou a seguir na carreira científica, dando o suporte necessário para meu amadurecimento como cidadão e filho.

A minha noiva Valéria por suportar meus eternos atrasos, os 30 minutos que se transformavam em horas. Por sempre me incentivar a continuar nas horas difíceis e por me amar incondicionalmente durante todos esses anos de união.

A todos os amigos do laboratório: Ana Paula, Carolina, Isabela, José, Luciana, Renata, Ricardo, Thiago, William.

Aos amigos dos laboratórios de nosso grupo de pesquisa: Carlos Rodrigo, Cassia, Deison, Denise, Giovana, Juliana, Luis Henrique, Marina, Paola, Priscila, Rodrigo, Rogério, Sheila, Thatiana e Wendy.

Aos amigos de outros laboratórios onde a amizade ajudou a salvar vários experimentos: Diego, Cris (Xuxa), Tânia, Marlei, Elton, Lorena, Junior, Liliana, Vivian, José.

Um agradecimento especial a Ana Paula e Carolina, pela paciência e por seus ensinamentos durante esses anos de mestrado. Também aos amigos Ricardo, William, Thiago, Lucina e mais recentemente José por manterem sempre o bom astral no laboratório e suportar as madrugadas me auxiliando nos experimentos de cinética.

A FAPESP pela bolsa de mestrado processo 06/03987-7

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT	VI
1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.2 Vacinas de DNA ou RNA	3
1.3 Vacina de DNA hsp65 de <i>M.leprae</i> contra a Tuberculose	9
2. OBJETIVOS PROPOSTOS.....	11
2.1 Objetivos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Obtenção dos plasmídeos recombinantes pcDNA3-Hsp65, pcDNA-Hsp65-3A e pcDNA3	12
3.2 Quantificação dos plasmídeos purificados	13
3.3 Avaliação da integridade dos plasmídeos	13
3.4 Confeção dos <i>primers</i> e sequenciamento do inserto da Hsp65 presente nos plasmídeo pcDNA ₃ -Hsp65 e pcDNA-hsp65-3A	14
3.5 Obtenção do RNA mensageiro codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	15
3.6 Quantificação dos RNAs mensageiros codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	16
3.7 Avaliação da integridade dos RNAs mensageiros codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	16
3.7.1 Avaliação da integridade dos RNAs mensageiros codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> após o contato..... do mesmo com células HEK 293.	16
3.7.2 Avaliação da produção da proteína hsp65 codificada pelo RNAm-hsp65-orf, por <i>western-blot</i>	18
3.8 Análise da estrutura molecular dos RNAs mensageiros codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	19

3.9 Encapsulamento do RNAm-hsp65-orf em lipossomas do tipo DOTAP	19
3.10 Marcação do com Alexa 488 ou 594	19
3.11 Protocolo de microscopia confocal para a visualização da captura do RNAm por células pulmonares	20
3.12 Protocolo de FACS para identificação das células que capturam o RNAm	21
3.13 Obtenção do RNA e Síntese do cDNA utilizado no protocolo de PCR em tempo real.....	22
3.14 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (“Real Time PCR”).....	22
3.15 Ensaio de profilaxia com RNAm-hsp65-orf.....	23
3.15.1 Ensaio de profilaxia pela rota intramuscular, usando o RNAm-hsp65-orf.	23
3.15.2 Ensaio de profilaxia pela rota intranasal, usando o RNAm-hsp65-orf.....	23
3.16 Ensaio de imunogenicidade com RNAm-hsp65-orf.	24
3.16.1 Ensaio de imunogenicidade pela rota intramuscular, usando o RNAm-hsp65-orf	24
3.16.2 Ensaio de imunogenicidade pela rota intranasal, usando o RNAm-hsp65-orf	24
3.17 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos	24
3.18 Marcação das Células com CFSE.....	25
3.19 Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE	25
3.20 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocina s de células totais do baço.....	26
3.21 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas de células totais do pulmão.....	27
3.22 Protocolo de FACS para análise das células de memória	27
3.23 Determinação da viabilidade da cepa micobacteriana.....	27
3.24 Desafio dos animais com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
3.25 Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)	28
3.26 Análise histológica dos pulmões.....	29
3.27 Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Seqüenciamento dos plasmídeos utilizados como molde para a produção de RNAm.....	30

4.2 Confecção do RNAs mensageiros e análise de sua estrutura molecular.....	46
4.2.1 Avaliação da integridade do após diferentes tempos de incubação do mesmo com células HEK293.	52
4.2.1 Avaliação da produção da proteína hsp65 codificada pelo	54
4.3 Avaliação da resposta imune humoral e celular da vacina administrada por via intramuscular.	55
4.3.1 Produção de anticorpos anti-HSP65	55
4.3.2 Proliferação de células totais do baço de animais vacinados por via intramuscular.	58
4.3.3 Produção Produção de citocinas por células totais do baço de animais vacinados por via intramuscular com RNAm-hsp65-ORF.....	60
4.4 Ensaio de proteção usando três doses de RNAm-hsp65-ORF por rota intramuscular.	64
4.5 Análise histopatológica do pulmão dos camundongos vacinados com três doses de RNAm-hsp65-ORF por via intramuscular	65
4.6 Avaliação da resposta imune humoral e celular das vacinas administradas por via intranasal	67
4.6.1 Produção de anticorpos específicos à HSP65	68
4.6.2 Avaliação da produção de citocinas por células isoladas do baço ou de linfonodos drenantes pulmonares de animais após 15 dias da vacinação intranasal com RNAmhsp65-ORF.	73
4.6.3 Avaliação quantitativa das subpopulações de células T com fenótipo: CD4 ou CD8 ou, CD4/CD44 ^{hi} /CD62 ^{Low} e CD8/CD44 ^{hi} /CD62 ^{Low} presentes no pulmão dos animais imunizados com RNA-mhsp65-ORF	78
4.6.4 Avaliação da expressão gênica de fatores de transcrição importantes na resposta imune.....	82
4. Protocolo vacinal usando uma dose de RNA-mhsp65-ORF nu ou encapsulado pela rota intranasal	84
4.7.1 Análise histopatológica do pulmão dos camundongos vacinados com uma dose de RNA-mhsp65-ORF por via intranasal.....	86

4.8 Avaliação da captura do RNA-mhsp65-ORF por células pulmonares.....	88
4.8.1 Cinética da quantificação da capacidade das células apresentadoras de antígeno profissionais em capturar o RNA-mhsp65-ORF	88
4.8.2 Análise por microscopia de fluorescência da capacidade de células pulmonares em capturar o RNA-mhsp65-ORF.....	92
5. DISCUSSÃO.....	95
6. CONCLUSÕES.....	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ABREVIATURAS

APC: Allophycocyanin (Aloficocianina)

ARCA: Anti-reverse Cap analog (Analago anti-reverso de cap)

BCG: Bacilo Calmet Guiran

Blast: Basic local alignment search tool (Ferramenta de busca e alinhamento local básico)

BSA: Albumina soro bovina

CD: Cluster differentiation

cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementar

CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl Ester

Con-A: Concanavalina – A

D.O: Densidade ótica

DNA: Ácido desoxidoribonucleico

DNase: Desoxiribonuclease

DOTAP: 1,2-dioleoyl-3trimethylammonium propane

DTT: Dithiothreitol

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein* (Proteína fluorescente verde enriquecida)

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FACS: Citometria de fluxo

FDA: Food and Drug administration

GFP: *Green Fluorescent Protein* (Proteína fluorescente verde)

HEK 293: Human Embryonic cells 293

HIV: Human immunodeficiency virus

ICB-USP: Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo

IFN- γ : Interferon gamma

IgA: Imunoglobulina A

IgG1: Imunoglobulina G grupo 1

IgG2A: Imunoglobulina G grupo 2A

IgM: Imunoglobulina M

IL10: Interleucina 10

IL12: Interleucina 12

IL5: Interleucina5

Kb: Kilobases

LB: Lúria Bertran

LPS: Lipopolisacarídeo

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

MOPS: 3-(N-morphilino)propanesulfonic acid

NPT-FMRP: Nucleo de Pesquisas em Tuberculose – Faculdade de medicina de ribeirão preto

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPD:O-phenylenediamine dihydrochloride

ORF: *Open Read Frame* (Fase aberta de Leitura)

PAMPs:

PBS: Phosphate Buffered solution

PCR: *Polymerasis Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PE: *Phicoerytrin* (Ficoeritrina)

PercyPE: Percy-Phicoerytrin

PLGA: Poli (D,L-lático-co-glicólico)

RNA: Ácido ribonucléico

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro

RNase: Ribonuclease

RPMI: Meio de Cultura

RT-PCR: *Real time Polymerasis Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)

Th1: T Helper 1

Th2: T Helper 1

TLR3: *Toll Like Receptor 3* (Receptor do tipo toll 3)

TNF-alfa: Fator de necrose tumoral alfa

Toll 7: *Toll Like Receptor 7* (Receptor do tipo toll 7)

tRNA: Ácido ribonucléico transportador

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

RESUMO

O uso do RNA mensageiro como estratégia para a estimulação do sistema imune tem sido utilizado atualmente principalmente em estratégias para a terapia do câncer. Esse trabalho demonstra que a utilização de um RNA mensageiro, codificando para a proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae*, como estratégia vacinal para o controle da tuberculose experimental tem grande potencial. Nossos dados mostraram que a vacinação de camundongos com uma única dose de 10ug desse RNAm nu, por via intranasal foi capaz de induzir uma resposta imune protetora contra o subsequente desafio com cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Tal efeito não foi observado quando o mesmo foi dado via intramuscular ou encapsulado em lipossomas pela via intranasal. Embora a vacinação com RNAmhsp65-ORF nu reduziu a carga bacilar nos animais vacinados, não levou a um aumento dos níveis de anticorpos IgG1, IgG2A, IgM e IgA anti-hsp65. Além disso, a análise de células de memória do fenótipo T CD44^{hi}/CD62^{low}, não mostrou diferença entre os grupos analisados. Por outro lado, quando se analisou o perfil de expressão dos fatores de transcrição T-bet e Gata-3 ficou demonstrado que o grupo que recebeu RNAmhsp65-ORF nu, embora não tenha induzido altos níveis de T-BET apresentou níveis menores de GATA-3 em relação aos grupos controles. Esses dados sugerem que a vacinação com o RNAm nu, pela via intranasal, foi capaz de sustentar uma resposta imune por trinta dias, tempo do desafio, com um padrão mais do tipo misto e/ou tendendo ao Th1, o que pode estar relacionado com a proteção observada. Para verificar quais as sub-populações de células apresentadoras de antígeno presentes no pulmão eram capazes de capturar o RNAm injetado por via intranasal foram realizados experimentos de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Esses experimentos demonstraram que 30 minutos e até 8 horas após o inoculo, essas células foram capazes de capturar o RNAm injetado. Após 8 horas foi possível verificar que a molécula de RNAmhsp65-ORF estava quase totalmente no citosol celular. Pode-se concluir então que a vacinação com RNAm por via intranasal foi eficiente nesse tipo de estratégia e abre perspectivas para uso em outras patologias bem como para o entendimento dos mecanismos envolvidos na indução da proteção observada.

ABSTRACT

The use of messenger RNA as a strategy for the stimulation of the immune system has been used mainly in current strategies for the cancer treatment. In this work we demonstrate for the first time that a messenger RNA of hsp65 protein from *Mycobacterium leprae* can be used as a vaccine strategy to experimental tuberculosis. Our data showed that the vaccination of mice with a single dose of 10ug of this naked RNAm through intranasal route was able to induce a protective immune response against subsequent challenge with virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. This effect was not observed neither the RNAm was given intramuscularly or by liposome using the intranasal route. Although vaccination with naked RNAmhsp65-ORF reduced the bacillary load in the treated group, there is no increased in the levels of IgG1, IgG2A, IgM and IgA antibodies hsp65 specific. Furthermore, the analysis of memory T cells with CD44hi/CD62low phenotype did not show difference between the different groups. On the other hand, when the profile expression of the transcription factors of T-bet and Gata-3 were examined, the group that was immunized with naked RNAmhsp65-ORF showed lower levels of GATA -3 when compared with T-BET. In the other hands BCG group showed a higher level of GATA-3 than T-BET. These data suggest that intranasal vaccination with the naked RNAm, has been able to maintain an immune response at time of the challenge, with a mixed Th1/Th2 pattern, which may be related the protection and tissue lung preservation. To determine the sub-populations of antigen presenting cells present in the lung involved in the RNAm capture we used a labeled RNAm. After intranasal injection the cells were analyzed by flow cytometry and fluorescencemicroscopy. These experiments showed that after 30 minutes the population of CD11c, CD11b and Cd19 cells were able to capture the RNAm. The RNAm could be detected until 8 hours after the inoculums in all cells analyzed. However the mainly APC involved in this uptake process was dendritic cells (CD11c+). When we analyzed the kinetics of intracellular uptake it is possible detected RNAm in the citosol, after 8 hours. Taken together, our results showed a novel and efficient strategy to control experimental tuberculosis. Beside that open novel perspectives to use of RNAm in vaccines against infectious diseases as well as to clarify the mechanisms involved in the induction of protection observed.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Uma rápida busca no banco de dados PUBMED, com a sigla RNA nos mostra mais de 66 mil artigos científicos. Grande parte dessa pesquisa tem como ponto inicial a característica funcional do RNA, isto é, o envolvimento dos diversos tipos de RNAs na síntese protéica (Watson, 1963). Desde o início da biologia molecular, cientistas vêm tentando utilizar os ácidos nucléicos como ativadores do sistema imune. Mesmo sabendo que, nessa época, pouco se conhecia sobre esse fenômeno, o primeiro relato do uso de RNA como imuno estimulante data de 1968, realizada por Rigby (Rigby, 1968). Em 1969 foi demonstrado que RNA de dupla fita era capaz de induzir a produção de interferon gama por macrófagos murinos (Absher e Stinebring, 1969). Essa metodologia era realizada da seguinte forma: O RNA total extraído de tecidos linfóides de animais previamente inoculados com linhagens celulares cancerosas como a B16 era incubado com células totais do baço de animais naïve e, posteriormente, estas células eram inoculadas em animais sadios. Essa vacinação utilizando células “primadas” com RNA total, em diversos casos levava a proteção após posterior desafio com linhagens tumorais (Schlager, Paque *et al.*, 1975). Diferentes variações desse protocolo foram descritos, sendo que uma delas utilizava RNA extraído de tecidos linfóides de diferentes espécies e que era, posteriormente, utilizado como terapia em câncer humano (Fritze, Kern *et al.*, 1976). Várias discussões ocorreram quanto ao real efeito deste “RNA Imune”, pois não se conhecia qual era o mecanismo desencadeado pela incubação do RNA com células totais do baço. Para tentar esclarecer algumas dúvidas, experimentos controle foram utilizados tais como: o uso de RNAses, que inibiam a ativação das células, ou seja, o efeito do RNA, o uso de DNAses ou proteinases não interferiam na imunidade gerada pelo RNA, demonstrando que o fenômeno observado era RNA dependente (Friedman, 1976).

O uso do RNA como transmissor de imunidade foi utilizado como estratégia para gerar proteção nas infecções por tripanossomatídeos usando, como estímulo, o RNA de

uma linhagem de trypanossoma avirulenta. Após a transferência das células do baço estimuladas com tais RNAs, o camundongo era, subseqüentemente, desafiado com uma cepa virulenta de trypanossoma. A proteção observada ressaltava que o RNA utilizado apresentava características imunoprotetoras, independentemente da fonte de onde era obtido, sendo o efeito protetor antígeno específico (Lemos e Menezes, 1978). Esses estudos culminaram com o primeiro teste clínico realizado em 1981 onde se observou que as injeções de linfócitos de cobaias, previamente incubados com RNA total de uma linhagem tumoral humana, não mostraram efeitos tóxicos e levaram a diminuição de tumores renais e pulmonares nos pacientes que receberam essa terapia (Steele, Wang *et al.*, 1981).

A grande importância desses trabalhos foi a demonstração de que as moléculas de RNA eram capazes de levar a ativação do sistema imune. Porém, nessa época, com o advento da engenharia genética os pesquisadores ficaram tentados a descobrir qual tipo de RNA, era na verdade o responsável pelo fenômeno da indução da resposta imune. Além disso, muita discussão foi gerada entre os pesquisadores, pois, não era completamente conhecido o papel imuno estimulador do RNA. Com isso, o uso do RNA imune diminuiu e não foram levados a frente os testes clínicos em humanos (Passos G.A. Comunicação pessoal). Assim os mecanismos desencadeados pelo RNA imune permanecem obscuros até hoje.

Nessa mesma época outros pesquisadores demonstraram outras facetas do uso do RNA com imuno estimulante. Em 1979 Wells e colaboradores utilizaram um RNA de dupla fita (BRL 5907) como adjuvante em uma composição vacinal contra o vírus parainfluenza 3 em carneiros. Esse trabalho mostrou que o uso desse adjuvante aumentou a produção de anticorpos específicos culminando na proteção dos carneiros em desafio subseqüente (Wells, Sharp *et al.*, 1976). Em 1983 Kashiba e colaboradores, demonstraram que a administração de RNA transportador, isolado de *Salmonella typhimurium*, era capaz de gerar uma resposta imune protetora a essa mesma bactéria. Os pesquisadores tiveram o cuidado de comparar seus resultados com uma dose de LPS, que não levou a proteção, confirmando o efeito específico do tRNA (Kita e Kashiba, 1983). Murad e colaboradores mostraram que moléculas de RNA não codantes poderiam levar a ativação da PKR, sugerindo um possível mecanismo de ação dessas moléculas (Murad, De Souza *et al.*, 2006).

Por volta de 1990, outra molécula de ácido nucléico começou a ganhar evidência no cenário científico: o DNA plasmidial. Seguindo a mesma linha de proteção mediada por ácidos nucléicos, porém usando moléculas de DNA plasmidial, foi demonstrado que tais moléculas poderiam ser utilizadas para induzir a expressão de proteínas heterólogas em sistemas eucarióticos. Trabalhos pioneiros de Wolff e colaboradores demonstraram que a injeção intramuscular de plasmídeos bacterianos ou do RNA mensageiro, que codificavam para a enzima beta galactosidase levava a produção da proteína codificada *in vivo*. (Wolff, Malone *et al.*, 1990). Cabe ressaltar que essa foi a primeira abordagem utilizando-se RNA mensageiro de uma determinada proteína com objetivo subsequente de induzir sua produção. A partir desse marco introdutório, que demonstrou a possibilidade do uso desses ácidos nucléicos como indutores da expressão protéica, novos campos de pesquisa foram iniciados gerando o desenvolvimento da vacinologia e o aprimoramento da terapia gênica. Do ponto de vista estrutural essas moléculas são bem diferentes, sendo o DNA plasmidial bacteriano circular, enquanto o RNAm é uma estrutura complexa com várias alças e dobramentos, porém ambas podem ativar o sistema imunológico de diferentes formas.

1.2 Vacinas de DNA ou RNA

Comparado ao RNA, o uso de plasmídeos como veículos vacinais foi rapidamente desenvolvido. Com os trabalhos de Tang *et al.* (1992), Fynan *et al.* (1993) e Ulmer *et al.* (1993), essa estratégia ganhou evidência e credibilidade, desde que, com o uso de genes repórteres, esses pesquisadores demonstraram a expressão *in vivo* da proteína, com conseqüente indução da resposta imune humoral e celular. Essa estratégia foi demonstrada através da proteção contra o vírus influenza em camundongos, utilizando-se uma vacina de DNA (Ulmer, 2001). Um dos mecanismos que chamou a atenção para esse tipo de imunização foi baseado no fato da vacinação com DNA plasmidial mimetizar o efeito de vacinas vivas atenuadas, pois leva a produção de antígenos endógenos, sem a necessidade de se introduzir um microorganismo atenuado podendo ser utilizada em indivíduos imunocomprometidos (Huygen, 2005) além de ter menor custo de produção e armazenamento (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000). Assim, estava consolidada a estratégia de vacinas de DNA visando à aplicação clínica.

O uso de vacinas gênicas como profilaxia foi comprovado em vários modelos experimentais desenvolvendo-se vacinas contra leishmania (Carter, Henriquez *et al.*, 2007), tripanossoma (Chou, Hisaeda *et al.*, 2007) e diferentes tipo de vírus (Tesoro-Cruz, Calderon-Rodriguez *et al.*, 2008)

No entanto, como toda nova metodologia que utiliza DNA, a liberação das vacinas de DNA para uso clínico implica na observação de determinadas características, tais como: a exclusão de sua possível incorporação ao genoma da célula hospedeira; o controle de sua biodistribuição pelo organismo; e o não desencadeamento de doenças auto-imunes (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000). Dessa forma, apesar do sucesso das vacinas de DNA em modelos experimentais murinos, esta estratégia de vacinação quando usada em primatas não humanos, mostra-se menos eficiente, possivelmente devido à necessidade de altas doses de DNA necessárias para gerar proteção (Ulmer, 2001). Uma forma de aperfeiçoar esse tipo de metodologia seria entender a interação de um DNA plasmidial com células eucarióticas, como por exemplo, determinar; a biodistribuição do plasmídio no organismo, seu tráfego dentro da célula eucariótica e até mesmo avaliar diferentes sistemas de liberação com intuito de reduzir a dose e manter a eficiência, evitando uma possível integração cromossômica quando em doses elevadas. Nesse sentido, Trombone e colaboradores (Trombone, Silva *et al.*, 2007) usando a vacina de DNAhsp65 realizaram um estudo sobre o tráfego intracelular do DNA plasmidial demonstrando as dificuldades enfrentadas pelo DNA procariótico dentro da célula eucariótica (captura, tráfego endossomo / lisossomo - núcleo). Os dados obtidos podem justificar a necessidade de altas doses de DNA para induzir proteção, uma vez poucas moléculas de plasmídio atingem o núcleo. Desse modo em ensaios clínicos a dose ideal está em torno de miligramas por injeção. Assim, se por um lado há necessidade de altas doses de DNA para gerar proteção, por outro essa quantidade de material gênico procariótico pode facilitar uma incorporação genômica, que com doses menores não ocorreria. Análises desse ponto de vista favorecem o desenvolvimento de novas construções e/ou uso de formulações específicas, visando a diminuição da dose do material gênico. Algumas alternativas para diminuição da dose têm sido realizadas com sistemas de liberação, tais como o uso de microesferas de PLGA [Poli (D,L-lático-co-glicólico)]. Lima e colaboradores, usando um plasmídeo contendo o gene codificador para a hsp65 de *M. leprae* encapsulado em PLGA conseguiram obter proteção contra a

tuberculose experimental. O uso de sistemas como lipossomas e microesferas conferem uma vantagem adicional, a de proteger o DNA da degradação de nucleases e, conseqüentemente, diminuindo a dose administrada.

Interessantemente, a rota usada para veiculação da vacinas gênicas tem demonstrado uma influência direta no perfil de resposta imune induzida. O uso de lipossomas pela rota intranasal, pode diferir da veiculação do DNA no dado intramuscular ou subcutâneo pelo sistema do gene gun, levando desde a perda de proteção até a necessidade de diferentes doses (Lima, Bonato *et al.*, 2001).

Paralelo a este problema, outra questão relevante diz respeito à segurança das vacinas de DNA plasmidial, dentre elas, a possibilidade de integração do plasmidial no genoma do hospedeiro podendo, assim, interferir na ativação de oncogenes ou na inativação de genes supressores de tumor (Donnelly, Berry *et al.*, 2003), (Klinman, Takeno *et al.*, 1997) ou ainda, pelo fato da capacidade das moléculas de DNA poderem persistir por longo tempo no núcleo, o que poderia gerar grandes quantidades da proteína transgênica resultando em tolerância. Além disso, há a preocupação de que a vacina de DNA possa levar ao desenvolvimento de anticorpos anti-DNA (Gilkeson, Phippen *et al.*, 1995) e induzir doenças autoimunes como por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide. Dentro desse contexto, nosso laboratório, demonstrou que o DNA plasmidial da hsp65 de *Mycobacterium leprae* usada como vacina contra a tuberculose experimental, apresenta ampla biodistribuição no organismo, mas não se incorpora ao genoma da célula hospedeira na dose de 100 µg via intramuscular (Coelho-Castelo, Trombone *et al.*, 2006). Como cada estrutura vacinal usando DNA é única, não há como generalizar a biosegurança dada por uma formulação às demais em uso. Isso gera grandes preocupações em órgãos como OMS e FDA, que fazem restrições a esse tipo de estratégia como profilaxia em geral. Desse modo, devido aos possíveis riscos associados à vacinação com DNA plasmidial acima apontados, uma alternativa interessante seria o uso do RNA mensageiro (RNAm) como molécula responsável pela introdução do antígeno/vacina, tornando os riscos acima discutidos praticamente irrelevantes. Quando, em 1995, foi comprovado que a injeção de RNAm codificando para a enzima luciferase ou para o antígeno carcinoembrionário, usando 10 doses de 50µg, levava a produção de anticorpos específicos, o potencial desse tipo de vacina foi consolidado (Conry, Lobuglio *et al.*, 1995).

Quando o RNAm é usado como vacina, o antígeno é produzido assim que o RNAm penetra no citosol da célula hospedeira, diferente do que ocorre na vacinação com DNA plasmidial, onde o DNA precisa vencer a barreira da membrana nuclear para ser primeiramente transcrito e depois traduzido no citosol. Dados obtidos por Trombone e colaboradores (2007), mostraram que o DNA plasmidial chega à membrana perinuclear ainda em vesículas endossômicas. O mecanismo de entrada e saída no núcleo ainda não é conhecido, mas isso representa uma barreira a mais a ser vencida pela molécula de DNA plasmidial. Dessa forma, baseado apenas nesses aspectos, com o uso de RNAm o antígeno a ser produzido não enfrentaria tantos obstáculos, podendo ativar o sistema imune mais rapidamente.

A partir da síntese protéica, os passos seguintes são os mesmos para ambas as vacinas, ou seja, os antígenos expressos endogenamente são degradados em peptídeos pelo proteossoma e, em seguida, transportados para o retículo endoplasmático, onde são associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade do tipo I. A apresentação deste complexo (peptídeo-MHC de classe I) na superfície das células apresentadoras de antígenos poderá ativar os linfócitos T CD8 (Rock, York *et al.*, 2002). Por outro lado, parte dos antígenos produzidos pelas células hospedeiras pode ser secretado para o meio exterior, sem sofrer processamento, podendo, tanto estimular linfócitos B a produzirem anticorpos específicos, quanto serem endocitados por outras células apresentadoras de antígenos e estimularem linfócitos T CD4 agora como antígeno exógeno (Bryant, Lennon-Dumenil *et al.*, 2002; Pascolo, 2008). Desta forma, em geral a vacinação com RNAm, semelhante a de DNA, poderá estimular linfócitos B, linfócitos T citotóxicos (CD8) e linfócitos T helper (CD4). Não se pode excluir nesse mecanismo de ativação de linfócitos T CD4, a participação do *cross-priming*, onde o antígeno endógeno atingiria a rota de classe II por diferentes mecanismos estimulando linfócitos T CD4. Cabe ressaltar que os mecanismos de apresentação acima citados não são mutuamente exclusivos e todos podem participar na resposta imune induzida por vacinas de DNA (Doe, Selby *et al.*, 1996).

Diversas metodologias foram desenvolvidas para o uso do RNAm como vacina, visando a sua otimização. Nesse sentido, cinco métodos de vacinação utilizando RNAm têm sido descritos:

- 1 - administração direta do RNAm nú (Hoerr, Obst *et al.*, 2000), (Carralot, Probst *et al.*, 2004),
- 2 - RNAm replicativo (Zhou, Berglund *et al.*, 1994), (Aberle, Aberle *et al.*, 2005),
- 3 - RNAm encapsulado em lipossomas (Martinon, Krishnan *et al.*, 1993), (Zhou, Hoon *et al.*,

1999), 4 - RNAm adsorvido em partículas de ouro (*gene gun*) (Qiu, Ziegelhoffer *et al.*, 1996) e, 5 - transfecção *in vitro* de células apresentadoras de antígenos com RNAm (Boczkowski, Nair *et al.*, 1996).

Alguns pesquisadores desenvolveram estratégias de imunizações baseadas em RNA replicativo, ou seja, o RNAm codifica o antígeno de interesse pela uso da RNA replicase viral. O uso do RNA replicativo é capaz de gerar uma potente resposta imune, provavelmente pela maior quantidade de antígeno e pela capacidade intrínseca de alguns vetores estimularem inespecificamente o sistema imune provavelmente através de receptores clássicos de resposta imune inata. Esta estimulação pode ser atribuída à interação dos RNAs intermediários de fita dupla, gerados durante a replicação do RNA. Esses RNAs de fita dupla induzem a apoptose das células apresentadoras de antígenos, via receptores do tipo Toll 3 (TLR3), desta forma, os corpos apoptóticos contendo o RNA replicativo são capturados por outras células apresentadoras de antígenos, induzindo assim a estimulação da resposta imune (Alexopoulou, Holt *et al.*, 2001). Recentemente, foi demonstrado que a administração intramuscular de RNAm replicativo codificando o antígeno MPT83 e a RNA replicase do vírus Sindbis foi capaz de induzir resposta imune humoral e celular específicas com produção IFN γ , além de conferir proteção significativa contra o desafio com *M. tuberculosis*. Apesar da eficiência deste método, a utilização da RNA replicativo como vacina gênica para ensaios clínicos não é considerada segura, pois há a possibilidade de que o RNAm replicativo recombine com outros RNAs virais podendo assim gerar novos patógenos (Xue, Stavropoulos *et al.*, 2004).

Outra abordagem para a vacinação com RNA, como mencionado anteriormente, é o encapsulamento do RNAm em lipossomas. A utilização dos lipossomas baseia-se no fato de que eles são facilmente capturados pelas células apresentadoras de antígenos após a injeção, liberando assim o RNAm diretamente no citosol, e além disso, esta formulação protege o RNAm da ação deletéria de ribonucleases. Semelhante as outras abordagens (RNAm nú e RNA replicativo) RNAm encapsulado em lipossomas é capaz de gerar uma resposta imune (Zohra, Chowdhury *et al.*, 2007) porém, a maioria dos lipossomas podem ser citotóxicos, impedindo assim o uso dessas formulações em humanos.

Ainda em busca de outros métodos para a vacinação com RNAm, destaca-se o *gene gun* ou biobalística. Esta técnica consiste na adsorção do RNAm, ou do DNA plasmidial, em micro

partículas de ouro, as quais são colocadas em um estágio de aceleração, por sistemas diversos baseados em uma onda de choque gerada por explosão química, descarga de hélio sobre alta pressão ou descarga de ar comprimido. Desta forma, o RNAm é introduzido diretamente no citosol das células alvos, diminuindo a possibilidade de degradação por nucleases. Esta técnica apresenta ainda outras vantagens, tais como, pequena quantidade de ácido nucléico (menos do que um nanograma) que é usado em uma dose da vacina (Mandl, Aberle *et al.*, 1998) e a estabilidade desse tipo desta formulação que pode ser estocada a temperatura ambiente por longos períodos sem que ocorra a degradação do RNAm (Vassilev, Gil *et al.*, 2001). Recentemente Steiz e colaboradores (2006) mostraram a indução de uma resposta imunológica anti-melanoma utilizando RNAm expressando uma proteína de fusão EGFP.TRP2. Esse trabalho também utilizou a técnica *gene gun* para a administração do RNAm e demonstrou a produção de anticorpos específicos para esse antígeno em quantidade similar a resultados obtidos utilizando-se DNA plasmidial. (Steitz, Britten *et al.*, 2006) No entanto, em vacinas de DNA, a utilização do *gene gun* em geral, leva a ativação de uma resposta imunológica do tipo Th2, o que muitas vezes não confere proteção a patógenos intracelulares (Doe, Selby *et al.*, 1996). Em 2004 foi demonstrado que células do sistema imunológico como as células dendríticas, são capazes de distinguir entre RNAs bacterianos e RNAs eucariotos, a hipótese levantada para essa distinção foi a tamanho da cauda poli-A existente nas bactérias em detrimento a grande cauda existente nos RNAs de eucariotos (Koski, Kariko *et al.*, 2004). Após essa publicação foi descrito o mecanismo de reconhecimento de RNA de fita simples e dupla por células eucarióticas. No caso do RNA de fita simples foram testados oligonucleotídeos com seqüências ricas em guanossina e uracila. Essas seqüências após complexadas a lipídeos catiônicos como DOTAP e posteriormente encubadas com células dendríticas foram capazes de estimular a produção de TNF- α . (Koski, Kariko *et al.*, 2004). Outro estudo que utilizou formas de RNA fita simples mais complexas como RNA mensageiro bacteriano, RNA total do vírus Influenza e RNA codificando para GFP sem a cauda poli-A. Em todos esses casos apenas células que continham o receptor do tipo Toll 7 foram capazes de responder a esse estímulo produzindo interferon-alfa (Diebold, Kaisho *et al.*, 2004). Porém, uma pergunta ainda se mostrava perturbadora: como as células não reconheciam o RNA próprio quando o mesmo estava no citoplasma após a tradução ou mesmo na montagem de tRNAs e ribossomos. A resposta para essa pergunta pode ser reduzida a palavra

compartimentalização. Foi demonstrado que os três receptores do tipo Toll que reconhecem RNA (TLR 3, 7, 8 em camundongos) têm localização citoplasmática intracelular, mais precisamente em fagócitos nascentes, o que evita o contato direto com RNAs próprios (Nishiya, Kajita *et al.*, 2005). Essa constatação faz sentido desde que os principais alvos desses IIRs são moléculas de RNA de simples ou dupla fita provenientes de infecções virais.

O desenvolvimento da tecnologia do RNA tem revelado abordagens terapêuticas bem interessantes, como o uso de ribozimas em pacientes HIV positivos ou com câncer em fase terminal. Embora os estudos ainda não estejam finalizados, os autores sugerem que essas abordagens podem ser eficientes em diferentes patologias. Outra abordagem, não menos interessante, é mediada pela ação do RNA de interferência, embora ainda restrita a avaliação *in vitro* (Sanguino, Lopez-Berestein *et al.*, 2008).

1.3 Vacina de DNA hsp65 de *M.leprae* contra a Tuberculose

A busca por uma nova vacina eficaz contra a tuberculose levou ao desenvolvimento pioneiro da vacina de DNA codificando para a proteína de 65 kDa de *Mycobacterium leprae* (HSP65), codificada pelo plasmídeo pcDNA3-HSP65, desenvolvida por Silva e colaboradores (1999) e, posteriormente, testada no Núcleo de Pesquisa em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (NPT-FMRP). As pesquisas realizadas com essa vacina demonstraram que o uso a proteína de choque térmico tem grande potencial tanto na profilaxia quanto na terapia da tuberculose experimental.

Em modelos experimentais murinos, a vacina se mostrou capaz de induzir proteção contra o desafio com uma cepa virulenta de *M. tuberculosis*, levando a um padrão de resposta imune do tipo Th1, com produção de IFN- γ e através de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos específicos ao antígeno. Por outro lado, a presença de anticorpos do isotipo IgG2A sugeria a presença de citocinas também do padrão T "helper" tipo 2 (Th2), mesmo que em baixas doses. Provavelmente a presença de um padrão misto de resposta imunológica deve ter contribuído para a ausência de lesão pulmonar com o controle da infecção (Lowrie, Silva *et al.*, 1997; Bonato, Lima *et al.*, 1998; Lima, Dos Santos *et al.*, 2003). Além do efeito profilático, essa vacina também apresentou efeito terapêutico isoladamente ou combinada a quimioterapia convencional para a tuberculose

reduzindo o tempo de tratamento (Lowrie, Tascon *et al.*, 1999). Os dados obtidos em murinos também foram confirmados em cobaias, considerado modelo experimental ideal para a tuberculose, mostrando a eficácia dessa vacina (De Paula, Silva *et al.*, 2007).

Embora a vacina de DNAhsp65 seja eficiente na tuberculose experimental e em terapia para alguns tipos de câncer (ensaios clínicos em finalização), o uso de DNA plasmidial ainda esbarra nas doses necessárias para induzir proteção. Assim, levando-se em conta as características da vacinação com RNA mensageiro já comentadas, e os aspectos positivos relacionados a biossegurança nesse tipo de estratégia, optamos por utilizar uma nova abordagem experimental utilizando o RNAm da hs65 de *M. leprae* como estratégias vacinais para a profilaxia da tuberculose experimental.

2. OBJETIVOS PROPOSTOS

2.1 Objetivos

Avaliar a atividade imunogênica do RNA mensageiro hsp65 e seu potencial protetor contra a tuberculose experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos plasmídeos recombinantes pcDNA3-Hsp65, pcDNA-hsp65-3A- e pcDNA3

Os plasmídeos recombinantes pcDNA3-Hsp65, pcDNA-Hsp65-3A e pcDNA3 (vetor) foram purificados por cromatografia de troca iônica, utilizando-se Endofree Plasmid GIGA Kit™ (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Para a realização desse protocolo, uma colônia de bactéria *Escherichia coli* DH5α™ transformada com o plasmídeo recombinante pcDNA₃-Hsp65, pcDNA-Hsp65-3A ou pcDNA3 foi retirada de uma placa recém preparada contendo meio LB agar (SIGMA, Germany) e ampicilina (Cilino™) na concentração de 100 µg/ml. Esta colônia foi inoculada em 5,0 ml de caldo LB Broth Base (INVITROGEN, Scotland) contendo ampicilina (100 µg/ml) e incubada durante 8 horas a 37°C sob agitação vigorosa (250 rpm) em incubadora (Incubador shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A cultura foi diluída 1/500 em 2,5 litros de caldo LB Broth Base, contendo ampicilina (100 µg/ml), e incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) durante 16 horas. Após esse período de incubação o material foi centrifugado a 5.500 rpm por 15 minutos a 4°C e o sedimento ressuspense em 125 ml de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase 100 µg/ml). Em seguida foram adicionados 125 ml de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%) e após 5 minutos adicionou-se 125 ml do tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH 5,5). O material foi filtrado, adicionado ao tampão ER (para remoção do LPS – composição não revelada pelo fabricante) e mantido no gelo por 30 minutos. O filtrado foi aplicado à resina da QIAGEN™, previamente equilibrada com tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15 %). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600 ml de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %) e o DNA plasmidial eluído com 30 ml de tampão QF (NaCl 1,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado com 52,5 ml de isopropanol e em seguida centrifugado a 14000 rpm por 45 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspense em 0,5 a 1,0 ml de água.

3.2 Quantificação dos plasmídeos purificados

A quantificação dos plasmídeos recombinantes pcDNA3-Hsp65, pcDNA-Hsp65-3A e pcDNA3 foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm utilizando o aparelho Gene Quant IITM (Pharmacia Biotech, Cambridge - England). Todas as amostras plasmideais foram submetidas ao teste cromogênico do lisado de amebócito de *Limulus polyphemus* (Kit QCL – 1000 – Quantitative Cromogenie – Bio Whittaker – CAMBREX Company) para avaliação do nível de endotoxina presente.

3.3 Avaliação da integridade dos plasmídeos

A presença do inserto da Hsp65 no plasmídeo pcDNA3-Hsp65 foi verificada utilizando as enzimas de restrição *Bam* H I e *Not* I (Invitrogen, life technologies). Um micrograma do plasmídeo pcDNA3-Hsp65 foi incubado com *Bam* H I e *Not* I na concentração de 1 unidade de enzima por µg de DNA a 37°C por 3 horas. Para o plasmídeo pcDNA-Hsp65-3A utilizou-se a enzima de restrição *Apa* I e *Bam* H I e para o vetor pcDNA₃ utilizou-se apenas a enzima de restrição BamH I. Em seguida os produtos da digestão de cada amostra, e também os plasmídeos não digeridos, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. (SIGMA-Aldrich, Germany). As amostras foram ressuspensas em tampão de eletroforese seis vezes concentrado (0,25 % azul de bromofenol; 40 % de sucrose em água) e o material submetido à eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,3). A corrida foi realizada a 76 V por 1 hora utilizando o aparelho da Life Technologies Inc., Modelo 250 (). O padrão de 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado como marcador de pares de base. O gel foi corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen) e a visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

3.4 Confeção dos *primers* e sequenciamento do inserto da Hsp65 presente nos plasmídios pcDNA3-Hsp65, pcDNA-hsp65-3A- e pcDNA3

Os *primers* foram construídos utilizando os programas *Primer Express* (ABI) e *Gene Runner* 3.05 (Hasting Software) levando-se em conta as seqüências M14341.1 (Merha, 1987) e AL 035159.1 (EMBO, 2002) da Hsp65 de *M. leprae*, devidamente depositados no GENBANK.

Tabela 1. *primers* construídos para sequenciamento dos plasmídeos

<i>Primers Foward</i>	<i>Primers Reverse</i>
F1-TAATACGACTCACTATAGGGAGAC	R1-ACCGAAGGTGTTGGATTC
F2-CAGTCGATCGGTGATCTGAT	R2-TACGGATCTAGGCCACTGC
F3-GAGGAGGTCGGTCTCACATTGG	R3-GCGCAGAACGTGTAACCTTCAC
F4-GTAACCTTTCAGTGGGTCAC	R4-CACGACTACCGAACATATC
F5-TGGGTGTTTCATAGGTGG	R5-GCTAGAAGGTTGCCGTATG
F6-CCCTTGCACCATTCTGC	R6-TGACACTGGGTGGAGGAAAG
F7- GTGTGTCGATCCTGTTGATG	BGH-TAGAAGGCACAGTCGAGG

Os *primers* foram construídos a partir da seqüência do plasmídeo pcDNA₃ (Invitrogen) e da seqüência do gene Hsp65, que está inserida nesse plasmídeo. O plasmídeo pcDNA₃-Hsp65 contém todo o segmento gênico dessa proteína juntamente com 1500 pares de base não transcritos, enquanto o plasmídeo pcDNA-hsp65-3A contém apenas a ORF (*Open Read Frame*) dessa proteína. Desta forma, foram desenhados quatorze *primers* para o sequenciamento completo do inserto da Hsp65 presente nos plasmídeos pcDNA₃-Hsp65, pcDNA-hsp65-3A- e pcDNA₃, sendo que, sete *primers* foram destinados ao Sequenciamento da fita *Foward* (F) e os outros sete *primers* para fita *Reverse* (R). As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de estudos do genoma Humano ICB-USP, utilizando o aparelho MegaBACE 1000 (sistema de análise de DNA de 96 capilares - GE Healthcare) e DYEnamic ET Dye Terminator

Kit (GE HeathCare). Os dados do seqüenciamento foram analisados utilizando-se a plataforma Phred-Phrap-Consed (Gordon, Abajian *et al.*, 1998), seguido pela análise no programa Blast (Altschul, Gish *et al.*, 1990). As análises de alinhamento pelo programa Blast2seq (Tatusova e Madden, 1999) e NEBCUTTER (Vincze, Posfai *et al.*, 2003) foram sempre realizadas utilizando-se as seqüências trimadas, isto é, analisadas e otimizadas, pelo programa Phrap.

3.5 Obtenção do RNA mensageiro codificando a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

Para a confecção do RNA mensageiro utilizou-se o Kit mMMESSAGE mMACHINE[®] T7 Ultra (Ambion, Austin, Texas, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Desta forma, primeiramente os plasmídeos pcDNA3-Hsp65, pcDNA-hsp65-3A- e pcDNA3 foram linearizados com a enzima de restrição *Bam* H I ou *Apa* I, respectivamente e, em seguida, uma alíquota das amostras foi analisada em gel de agarose 1% para confirmar a digestão total das mesmas. Após a linearização, as amostras foram tratadas com EDTA 0,5M (1:20), NaOAc 3M (1:10) e etanol (dobro volume) durante 15 minutos a -20°C para a remoção da enzima de restrição. A seguir, foram centrifugadas durante 15 minutos, 14000 rpm, 4°C, e o precipitado ressuspense em água. Para a transcrição *in vitro* utilizou-se 1 µg do DNA plasmidial linearizado juntamente com 10 µl do T7xNTP/ARCA (contém ATP, CTP,UTP e GTP e o CAP/ARCA), 2µl do tampão 10xT7, 2µl da enzima T7 polimerase e 10µl de água. A reação foi incubada a 37°C, durante 1 hora. A seguir, para a remoção do DNA *template*, as amostras foram tratadas com 1 µl de DNase durante 15 minutos a 37°C. Para a adição da cauda poli-A acrescentou-se 36µl de água, 20µl do tampão 5xE-PAP, 10µl de MnCl₂ 25mM, 10µl da solução ATP e 4µl da enzima E-PAP. Antes da adição da enzima E-PAP, 2,5µl da reação foram retirados para posterior uso como controle da reação de adição da cauda polia-A. A seguir, a reação foi incubada a 37°C durante 45 minutos. Para recuperar o RNA mensageiro as amostras foram extraídas pelo método fenol-clorofórmio seguido da precipitação em isopropanol (2 horas, -70°C). Após centrifugação (15 minutos, 4°C), o precipitado foi ressuspense em 30µl de água e armazenado a -70°C até o momento do uso. Os RNAs mensageiros provenientes dos plasmídeos pcDNA3-Hsp65, pcDNA-Hsp65-3A foram denominados de RNAm-hsp65 e RNAm-hsp65-orf respectivamente

3.6 Quantificação dos RNAs mensageiros da proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

As quantificações do RNAm-Hsp65 e RNAm-hsp65-orf foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm utilizando o aparelho ND-1000 (NanoDrop Technologies – Wilmington– USA).

3.7 Avaliação da integridade dos RNAs mensageiros codificando a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

Os RNAs mensageiros foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (SIGMa) a 1,5%, em condição desnaturante. Para isto, as amostras dos RNAs mensageiros (1µg) foram aquecidas a 65°C por 15 minutos juntamente com tampão MOPS 10X (2µl), formaldeído (4µl), formamida (10µl) e brometo (200µg/ml - 1µl). Em seguida, adicionou-se 4µl do tampão da amostra 10 vezes concentrado (50 % glicerol; 10mM EDTA - pH: 8,0; 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xylene cyanol), e o material foi submetido a eletroforese em tampão MOPS (0,2M MOPS; 20mM acetato de sódio; 10 mM EDTA – pH: 8,0). A corrida foi realizada a 80 V por 1 hora e meia utilizando cuba de eletroforese e fonte (Invitrogen). Os padrões de 0,5-10 Kb RNA Ladder (Invitrogen) ou de 0,28-6,6 Kb RNA Ladder (SIGMa) foram utilizados como marcadores de pares de base. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no aparelho ImageMaster VDS (GE).

3.7.1 Avaliação da integridade dos RNAs mensageiros da proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* após o contato com células HEK 293, por RT-PCR.

A integridade do após contato do mesmo com células HEK293 foi realizado como descrito abaixo.

Células HEK293 (ATCC-CRL-1573) foram cultivadas em placas de 24 poços em meio DMEM (Invitrogen) até a confluência de 70%. Nesse ponto as células foram lavadas e cultivadas em meio OPTMEN (Invitrogen) contendo 10ug de RNAm-hsp65-orf previamente preparado com

o agente transfectante TRANSMESSENGER (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Após 30 minutos, 2, 4, e 8 horas foi extraído o RNA total dessas células.

Para tanto as células foram lavadas três vezes com PBS 1x. Após essas lavagens as células foram ressuspensas em 1ml do reagente TRIzol (Invitrogen), e foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio para cada 1 ml de TRIzol, e o material foi agitado vigorosamente por 15 segundos e mantido por 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C durante 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa (sobrenadante) foi cuidadosamente recuperada, transferida para um novo tubo e o RNA precipitado pela adição 500 µl de isopropanol. Após 10 minutos a temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 12.000 g, durante 10 minutos, a 4°C. O precipitado foi ressuspensão em 20-60 µl de água livre de RNase e Dnase (Invitrogen) e a quantidade de RNA total presente nas amostras quantificadas pelo GeneQuant II (GE). Após a extração do RNA total das células o mesmo foi utilizado para a produção do cDNA correspondente

Antes da síntese da fita simples de cDNA, o RNA total (1-10 µg) obtido como descrito acima, foi tratado com a enzima *Amplification grade* DNase I (Invitrogen) na presença de tampão contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 2 mM de MgCl₂. Utilizou-se 1 unidade da enzima para cada µg de RNA. A reação foi mantida por 15 minutos a temperatura ambiente, seguida da adição de 1 µl de EDTA a 25 mM e inativada a 65°C por adicionais 15 minutos. Esse material foi usado para a obtenção de cDNA fita simples. O controle da transcrição foi realizado com 1 - 3 µl do material tratado com DNase I. Tal material foi submetido diretamente a reação de PCR e denominado RT negativo: RT [-].

O material obtido do tratamento com DNase I foi utilizado para a síntese de cDNA fita simples com a *SuperScript™II* (Invitrogen). Para cada 5 µg de RNA total foi adicionado 1 µl de oligo (dT)₁₂₋₁₈ [500 µg/ml] (Invitrogen) e 1 µl da mistura de dNTP a 10 mM. A mistura foi mantida por 10 minutos a 70°C e, em seguida, em gelo por 2 minutos. Adicionou-se o tampão da enzima para concentração final de 50 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 0,02 mM de DTT. O material foi equilibrado a 42°C por 2 minutos e incubado com 1 µl (200 U) de *SuperScript™* (Invitrogen) durante 50 minutos a 42-45°C. A reação foi inativada pela

incubação a 70°C por 15 minutos e o material obtido utilizado para amplificação do cDNA específico.

Aproximadamente um décimo do material fita simples foi utilizado como molde para amplificação do cDNA específico. A reação (50 µl) foi conduzida na presença de 2,5 unidades da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 1,5 mM de MgCl₂. Os pares de *primers* utilizados para a amplificação da hsp65 foram: 5'- ATGGCCAAGACAATTGCGTAC - 3' e 5'- TTGAGCAGGTCCTCGTACTCAC-3', que amplificam o segmento de 1500 pares de base. Os pares de *primers* para a beta-actina foram: 5'GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA 3' e 5' CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC 3'.

Os *primers* foram utilizados na concentração de 10 pmoles. A reação foi incubada em um termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) por 3 minutos a 95°C, e, em seguida, submetida a 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos. Seguiu-se uma extensão final de 10 minutos e o material obtido analisado em eletroforese gel de agarose. A amplificação direta do pcDNA3-hsp65 por PCR foi realizada nas condições descritas acima utilizando-se 100 ng do DNA plasmidial como molde.

3.7.2 Avaliação da produção da proteína hsp65 codificada pelo RNAm-hsp65-orf, por *western-blot*.

Células HEK293 foram cultivadas em placas de 24 poços em meio DMEM (Invitrogen) até a confluência de 70%. Nesse ponto essas células foram lavadas e cultivadas em meio OPTMEN (Invitrogen) contendo com 10ug de RNAm-hsp65-orf previamente preparado com o agente transfectante TRANSMESSENGER (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Após 30 minutos, 2, 4, 8, 12 e 24 horas de incubação foi extraído o conteúdo protéico total dessas células utilizando o método descrito abaixo.

Após os tempos determinados acima as células foram lavadas três vezes com PBS 1x. Após as lavagens as células foram ressuspensas em 200µL do tampão RIPA (50mM Tris-cl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Na-deoxycholate, 1mM PMSF, 1x *Roche complete mini protease inhibitor cocktail* (Roche). A mistura foi imediatamente incubada por 20 minutos no

gelo e posteriormente centrifugada a 12000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse procedimento as amostras foram congeladas para a posterior análise por gel de SDS/PAGE.

Análises do perfil eletroforético dessas amostras foram realizadas em gel de poliacrilamida 10%. Antes de serem aplicadas no gel as amostras foram submetidas a desnaturação por ebulição em tampão contendo β -mercaptoetanol. As corridas foram feitas a 100V por aproximadamente 3 horas. Como padrão de peso molecular foi utilizado o *Page Ruller™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas, Lituania).

Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através do aparelho mini trans-blot® (BioRad, Hercules, USA) por 1,5 h a 150 V em tampão de transferência contendo metanol 20%; tris 6%; glicina 0,3%, pH 8,3.

A membrana foi então bloqueada com PBS contendo soro albumina bovina (BSA) 3% e Tween-20 0,05% por 2 h a temperatura ambiente. A membrana foi então encubada com anticorpo primário IgG de camundongo anti-hsp65 policlonal gentilmente cedido pelo Prof. Célio Lopes Silva, na diluição de 1:1000 por 18 h a 4°C sobre agitação constante. Após esse período, a membrana foi extensivamente lavada com PBS contendo 0,5% de Tween-20 e incubada com anticorpo secundario anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Invitrogen) na diluição de 1:5000, por 1 h a temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando o Kit de revelação “DAB Substrate Kit for peroxidase” (Vector, U.K).

3.8 Análise da estrutura molecular dos RNAs mensageiros da proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae*

A análise da estrutura molecular dos RNAs mensageiros foi realizada utilizando-se o programa Mfold (Zuker, 2003).

3.9 Encapsulamento do RNAm-hsp65-orf em lipossomas do tipo DOTAP

O RNAm-hsp65-orf utilizado para o encapsulamento no lipídeo DOTAP 1,2-dioleoyl-3trimethylammonium propane (ROCHE) foi primeiramente diluído para a concentração de 0,1 μ g/uL em solução de Ringer. Posteriormente essa solução foi aquecida a 80°C por 15 minutos

e, rapidamente, imerso em gelo por 5 min. Cinco ou 10 ug desse RNAm diluído foram separados e, a essa solução foi adicionado 30U do lipídeo DOTAP, além disso foi adicionado um volume de solução de Ringer que somado aos outros dois componentes totalizava 100uL. Essa solução foi agitada e incubada por 25min a temperatura ambiente. Finalizado esse procedimento essa solução está pronta para a administração. Cabe-se ressaltar que esse procedimento foi realizado sempre imediatamente antes de cada imunização.

3.10 Marcação do com Alexa 488 ou 594

O RNAm-Hsp65-orf foi marcado com fluorocromo Alexa 488 ou 594, utilizando-se o sistema ULYSIS® (Molecular Probes, Eugene Oregon, USA), com algumas modificações. Esse sistema de marcação utiliza um método químico denominado de Universal Linkage System™ (ULS) que permite a ligação estável do fluorocromo na porção N₇ da base guanina. Foram utilizados 10µg de por marcação. O a ser marcado foi ressuspense em 19µl do tampão de marcação e desnaturado a 95°C durante 5 minutos. As amostras foram colocadas em gelo para a adição de 2µl do reagente ULS (contendo o fluorocromo) e mais 1µl do tampão de marcação. A reação foi incubada a 90°C por 20 minutos. O foi purificado do excesso do reagente ULS através da precipitação com isopropanol (*overnight*, -20°C). Em seguida, foi ressuspense em água estéril e armazenado a -70°C até o momento de uso.

3.11 Microscopia confocal para a visualização da captura do RNAm-hsp65-orf por células pulmonares.

A determinação da captura do por células pulmonares foi realizada da seguinte forma. Camundongos BALB/c foram imunizados por via intranasal com 10ug de RNAm marcado com o fluorocromo Alexa 488, diluído em um volume final de 100uL de solução de Ringer. Após 8, 4, 2 horas e também 30 minutos os camundongos foram sacrificados e seus pulmões foram processados. Primeiramente, os pulmões extraídos foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo de fundo cônico (Falcon) de 50ml contendo 15ml de solução de digestão estéril. Essa solução foi preparada em meio de cultura RPMI-1640 incompleto contendo

0,5µg/ml de Liberase (Liberase Blendzyme – Roche, IN) e 25U/ml de Desoxiribonuclease I (Invitrogen). Após a adição da solução de digestão, os tubos foram incubados a 37°C, sob agitação constante de 250 RPM, durante 30 minutos. Após a digestão as células foram separadas da matriz pulmonar com auxílio de uma seringa de 10ml sem agulha e centrifugadas a 400g por 10 min, a 4°C. O *pellet* foi ressuspensão em 6ml de meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB para inibir a atividade da enzima liberase. As células presentes foram separadas do restante da matriz digerida utilizando-se organza estéril, seguida de lavagem da malha com mais 10ml de meio RPMI-1640 completo. As células obtidas foram centrifugadas a 400g por 10 min, a 4°C, ressuspensas em 1ml de meio RPMI-1640 completo e contadas em câmara de Neubauer. A concentração final foi acertada para 1×10^6 células/ml. Após este processo 2×10^5 células foram separadas e aplicadas em uma lamínula tratada previamente com o reagente BIOBOND (British-Biocell, Londres, Inglaterra), o qual favorece a aderência das células da lamínula de vidro. Após 30 minutos de incubação essa lamínula foi adicionada de 200 µl de paraformaldeído 2% por 15 minutos, tratadas com glicina 0,1M e lavadas com PBS 1X. Após montagem lâmina/lamínula as células foram visualizadas em microscópio confocal (Leica TCS SP5 - Leica Microsystems).

3.12 Protocolo de FACS para identificação das células do pulmão capazes de capturar o RNAm-hsp65-orf.

A determinação da captura do por células pulmonares foi realizada da seguinte forma. Camundongos BALB/c foram imunizados por via intranasal com 10µg de RNAm-hsp65-orf marcado com o fluorocromo Alexa 488, diluído em um volume final de 100µL de solução de Ringer. Após 8, 4, 2 horas e também 30 minutos os camundongos foram sacrificados e seus pulmões foram processados como descrito no item 3.11 para obtenção das células pulmonares. As células obtidas foram centrifugadas a 400g por 10 min, a 4°C, ressuspensas em 1ml de meio RPMI-1640 completo e contadas em câmara de Neubauer. A concentração final foi acertada para 1×10^6 células/ml. Posteriormente as células foram incubadas por 45 minutos a 4°C na presença do anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc Block™ - 2.4G2 PharMingen, San Diego, CA). As suspensões celulares (aproximadamente 1×10^6 células por tubo) foram incubadas, durante 30 minutos a 4°C, com diferentes anticorpos: anti-CD11c marcado com o fluorocromo (APC), anti-CD11b com o

fluorocromo (PercyPE) e anti-CD19 com o fluorocromo (PE) . Em seguida as amostras foram lavadas em PBS contendo 2% de soro bovino fetal e o *pellet* ressuspenso em 200 µl de PBS contendo 1% de formaldeído e analisadas por citometria de fluxo. Foram adquiridos 50.000 eventos por amostra. Como controles foram utilizados anticorpos não relacionados. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmigen e usados de acordo com as instruções do fabricante. As células foram adquiridas em um equipamento FACS CANTO (Becton, Dickinson, USA)

3.13 Obtenção do RNA e Síntese do cDNA utilizado no protocolo de PCR em tempo real.

O protocolo de obtenção do RNA total dos tecidos dos animais imunizados com o RNAm-hsp65-orf e da produção do cDNA a partir do mesmo foi realizado como descrito no item 3.7.1. Quando necessário para a extração do RNA total a partir de órgãos, os mesmos eram extraídos dos camundongos e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento o tecido era pulverizado em cadinho de cerâmica e o pó restante era encubado com Trizol.

3.14 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (“Real Time PCR”)

Para o experimento de Real Time PCR em cada reação foram utilizados 200ng de cDNA, 10pmol de cada *primer* (sense e anti-sense) e 12,5µl Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) em um volume final de reação de 25ul. A temperatura de anelamento utilizada foi de 58°C, e os genes amplificados e os *primers* utilizados estão descritos na Tabela II.

Tabela II- *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real

<i>Primer</i>	Foward	Reverse
beta-actina	agctgcgttttacaccctt	aagccatgccaatgtgtct
GATA-3	aggagtctccaagtgtgcgaa	ttggaatgcagacaccacct
T-Bet	ccctgtccagtcagtaact	cttctctgtttggctgget

As reações foram feitas no aparelho Rotor-gene (Corbett Life Science, Mortlake, NSW, Austrália). A análise da expressão gênica foi realizada em relação ao gene da beta-actina, após a normalização dos dados brutos, utilizando como parâmetros o Slope da curva de eficiência dos *primers* utilizados visto que os mesmos não tinham a mesma eficiência.

3.15 Ensaios de profilaxia com RNAm-hsp65-orf.

3.15.1 Ensaios de profilaxia pela rota intramuscular, usando o RNAm-hsp65-orf.

Para a vacinação intramuscular, camundongos Balb/c fêmeas foram vacinados com três doses de 40µg de RNAm-hsp65-orf com intervalos de duas semanas entre as doses (por via intramuscular). As vacinas de foram administradas em solução salina em um volume total de 100µl/dose nos músculos quadríceps, sendo o volume injetado de 50 µl/músculo. Como controles desse experimento um grupo de camundongos BALB/c recebeu uma dose única de BCG Monreau (1×10^7 - gentilmente cedida pela Secretaria da Saúde da Prefeitura de Ribeirão Preto) por via subcutânea, e outro grupo apenas recebeu solução salina em um volume total de 100µl/dose nos músculos quadríceps, sendo o volume injetado de 50 µl/músculo, no mesmo esquema de vacinação ao grupo que recebeu RNA.

3.15.2 Ensaios de profilaxia pela rota intranasal, usando o RNAm-hsp65-orf

Para a imunização intranasal, camundongos Balb/c fêmeas foram vacinados com uma dose de 5 ou 10µg de RNAm-hsp65-orf . As vacinas de foram administradas na forma de RNA nu ou encapsulado no lipossoma DOTAP, ambas formulações foram administradas no veículo de injeção “Solução de Ringer-Lactato” em um volume total de 100µL aplicado por via intranasal, sendo que cada narina recebeu 50 µL. Como controle um grupo foi imunizado com 100µL da solução de Ringer ou com uma solução composta de 30µL do lipídeo DOTAP somado a 70µL da solução de Ringer, Um grupo de camundongos BALB/c recebeu uma dose única de BCG Monreau (1×10^7 - gentilmente cedida pela Secretaria da Saúde da Prefeitura de Ribeirão Preto) por via subcutânea.

3.16 Ensaios de imunogenicidade com RNAm-hsp65-orf.

3.16.1 Ensaios de imunogenicidade pela rota intramuscular, usando o RNAm-hsp65-orf

Para os ensaios de imunogenicidade pela rota intramuscular foram realizados os mesmos esquemas de vacinação descritos no item 3.15.1, sendo que os camundongos foram sacrificados 15 dias após a imunização para a determinação dos parâmetros de imunogenicidade.

3.16.2 Ensaios de imunogenicidade pela rota intranasal, usando o RNAm-hsp65-orf.

Para os ensaios de imunogenicidade pela rota intranasal foram realizados os mesmos esquemas de vacinação descritos no item 3.15.2, sendo que os camundongos foram sacrificados 15 ou 30 dias após a imunização para a determinação dos parâmetros de imunogenicidade. Nesse protocolo os animais receberam um booster que consistiu na administração de 10ug de RNAm-hsp65-orf na forma de RNA nu diluídos em 100ul da solução de Ringer, 48 antes do sacrifício.

3.17 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos

A produção de anticorpos específicos anti-hsp65 foi avaliada por ELISA a partir dos soros pré-ímmunes e soros coletados de acordo com os protocolos de imunização. Placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp Nunc-Immuno plates), foram recobertas com 0,1 mL da proteína hsp65 recombinante (5 ug/mL) diluída em tampão de ligação (Na_2CO_3 14,3mM e NaHCO_3 10,3mM pH 9,6), e incubadas durante a noite, a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas (0,05% de Tween 20 em PBS) e bloqueadas por 1 hora a 37°C (1% gelatina). Após lavagem, as amostras foram adicionadas e incubadas por 2 horas, a 37°C. A seguir, as placas foram lavadas novamente e anticorpos monoclonais, anti-IgG1, anti-IgG2A, anti-IgA ou anti-IgM conjugados a biotina (PharMingen), foram adicionados para detecção de anticorpos específicos. Após lavagem, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos com StreptAB kit (Dako). Para detecção dos anticorpos, o substrato OPD (SIGMa, St Louis, USA) foi adicionado; a reação foi

finalizada pela adição de 50 uL de uma solução a 16% de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância foi realizada em 490nm em espectrofotômetro de placa.

3.18 Marcação das Células com CFSE

Após a purificação das células totais do baço as mesmas foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL (Falcon) contendo 10 mL de PBS 1x estéril. A suspensão foi centrifugada a 453 x g por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS, contadas na Câmara de Neubauer, novamente centrifugadas e foram ressuspensas de forma a ter uma concentração de $5-10 \times 10^6$ / mL. Na seqüência, um volume igual de solução 5mM de CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*) diluída 1:2000 foi adicionado no tubo e procedeu-se a incubação à temperatura ambiente por 5 minutos com agitação periódica. Decorrido o tempo de incubação, foi adicionado soro bovino fetal (Invitrogen) em cada tubo (aproximadamente 5% do volume total) para interromper o processo de marcação. Novamente foram adicionados 10 mL de PBS 1x estéril e centrifugou-se 2 vezes a suspensão a 453 x g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em RPMI contendo 10% de SBF, contadas e sua concentração acertada para realização do ensaio de proliferação.

3.19 Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE

Após marcação das células totais do baço com CFSE, as mesmas foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) em placas de 96 poço com fundo em U com em meio RPMI (SIGMa) suplementado com 10% de SFB (Invitrogen) contendo penicilina a 100 U/mL, estreptomicina a 100 µg/mL e gentamicina a 10 µg/mL (Invitrogen). O volume final da cultura foi de 250 µL. As células foram estimuladas *in vitro* separadamente com 10ug sonicado de BCG ou 20ug de HSP65 recombinante ou 40 µg/mL de concanavalina A (SIGMa) Após 120 horas de cultura, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo.

3.20 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas de células totais do baço

A produção de citocinas a partir de células totais do baço foi avaliada por ELISA 15 dias após a imunização intramuscular ou intranasal. Após esse tempo os animais foram sacrificados e as células do baço (5×10^6 células) foram plaqueadas e estimuladas *in vitro* com $10\mu\text{g/mL}$ da proteína hsp65 ou com $20\mu\text{g/mL}$ de concanavalina A. Os níveis de citocinas no sobrenadante de cultura foram determinados por ELISA após 48 horas. Para determinação de citocinas no pulmão, placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates) foram sensibilizadas com $100\mu\text{L}$ de solução anticorpo monoclonal purificado específico para a citocina de interesse (PharMingen), diluído em tampão de ligação (Na_2HPO_4 $0,1\text{M}$ pH 9,0) numa concentração final de $1\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas a 4°C durante uma noite e posteriormente lavadas com PBS contendo $0,05\%$ de Tween 20 e bloqueadas com $200\mu\text{L/poço}$ de uma solução de 10% de soro bovino fetal em PBS (PBS/SFB 10%). Após incubação por 1 hora, a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e as amostras foram adicionadas ($100\mu\text{L/poço}$) juntamente com a curva padrão de citocina recombinante, diluída em PBS/SFB 10% /Tween $0,05\%$, e incubadas por uma noite, a 4°C . Após lavagem, a reação com o anticorpo de detecção foi realizada utilizando anticorpo anti-interleucinas biotilado ($100\mu\text{L/poço}$ do anticorpo diluído em PBS / SFB 10% / Tween 20 $0,05\%$ numa concentração final de $0,5\mu\text{g/mL}$ -PharMingen) e as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos com avidina biotina peroxidase StrepAB kit (Dako). Para detecção das citocinas, o substrato OPD (SIGMA) foi adicionado; a reação foi finalizada pela adição de 50 uL de uma solução a 16% de ácido sulfúrico. A leitura foi feita em leitor de ELISA a 490nm . A determinação das concentrações das citocinas foi realizada por interpolação dos resultados de absorbância obtidos nas amostras em relação aos da curva padrão.

3.21 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas de células totais do pulmão.

A produção de citocinas a partir de células totais do pulmão foi avaliada por ELISA após os protocolos de profilaxia intramuscular e intranasal (item 3.15.1e.2). Trinta dias após o desafio com cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*, os animais foram sacrificados e seus pulmões processados como descrito no item 3.11. As células obtidas foram centrifugadas a 400g por 10 min, a 4°C, ressuspensas em 1ml de meio RPMI-1640 completo e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem 5×10^6 células foram plaqueadas e estimuladas *in vitro* com 10µg/mL da proteína hsp65 ou com 20µg/mL de concanavalina A. Os níveis de citocinas no sobrenadante de cultura foram determinados por ELISA como descrito no item 3.20.

3.22 Protocolo de FACS para análise das células de memória.

Esse protocolo foi realizado para analisar a quantidade de células de memória presentes nos pulmões dos animais imunizados por via intranasal 30 dias após a imunização. Para isso após o processamento do pulmão e extração das células dos mesmos, protocolo já descrito no item 3.11, as células foram contadas e incubadas a 4°C na presença do anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc Block™ PharMingen). Posteriormente, as suspensões celulares (aproximadamente 1×10^6 células por tubo) foram incubadas, durante 30 minutos a 4°C, com diferentes anticorpos: anti-CD44 (Marcado com Cy5), anti-CD62L (Marcado com FITC), anti-CD4 (Marcado com PE) ou anti-CD8 (Marcado com PE). Em seguida as amostras foram lavadas em PBS contendo 2% de soro fetal bovino e o *pellet* ressuspendido em 200 µl de PBS contendo 1% de formaldeído e analisadas por citometria de fluxo. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra. Como controles foram utilizados anticorpos não relacionados apropriados. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmingen e usados de acordo com as instruções do fabricante.

3.23 Determinação da viabilidade da cepa micobacteriana

A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, armazenada a -70°C, foi repicada em meio líquido 7H9 enriquecido com Mildebrook ADC (BD Biosciences, Sparks, USA) e incubada

a 37°C, por 6 a 7 dias até crescimento bacteriano com turbidez correspondente à escala padrão de McFarland nº 1 (1.107 micobactérias/mL). A suspensão micobacteriana foi centrifugada a 3500 RPM por 15 a 20 minutos e o sedimento ressuspenso em 2,0 mL de PBS estéril. A 100µL desta suspensão foram adicionados 100µL de diacetato de fluoresceína (2µg/mL) e 100µL de brometo de Etidium (10mg/mL) (58). As micobactérias foram incubadas a 37°C por 10 minutos e a viabilidade foi determinada em microscopia de fluorescência (Leica). As micobacterias que apresentarem viabilidade superior a 80% foram filtradas em pré-filtro com poro de 8 a 10µm (Milipore), para desfazer grumos. Ao material filtrado foi adicionado PBS estéril e a turvação da suspensão ajustada para a escala de McFarland nº 1.

3.24 Desafio dos animais com *Mycobacterium tuberculosis*

Cada animal foi desafiado com 100µL de suspensão contendo 1×10^6 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv, por via intranasal, 30 dias após a última imunização intramuscular ou intranasal. Para esse procedimento, os animais foram previamente anestesiados com uma solução de tribromoetanol (ACROS ORGANICS) a 2,5% em PBS por via intraperitoneal.

3.25 Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)

Os animais infectados foram sacrificados, trinta dias após o desafio, e os pulmões foram coletados, pesados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo de 50 mL contendo 15 mL da solução de digestão [RPMI-1640 incompleto contendo 0,5µg/mL de Liberase (Liberase Blendzyme – Roche) e 25U/mL de Desoxiribonuclease I (Invitrogen)] para cada amostra e, em seguida, incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 30 minutos. Após a incubação, as células foram dispersas com o auxílio de uma seringa de 10mL e foi retirada uma alíquota para o ensaio de unidade formadora de colônia (UFC). A suspensão de células foi diluída seriadamente e 100µL foram plaqueados em meio 7H11. O número de unidades formadoras de colônias foi avaliado após incubação a 37°C por 30 dias.

3.26 Análise histológica dos pulmões

Para a análise histológica do pulmão dos animais desafiados, imunizados ou não, o lóbulo superior direito do pulmão de cada animal foi coletado e fixado em formol tamponado com fosfato. O material então foi processado e foram realizados os cortes histológicos (5 μ m). As lâminas obtidas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e analisadas em microscópio de luz. Esse procedimento assim como a análise histológica foi realizado pelo departamento de patologia da FMRP sobre supervisão da Profa.Dr. Simone Gusmão Ramos.

3.27 Análise estatística

Para realização da análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism 4.0 e foi empregado o teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

4. RESULTADOS

4.1 Seqüenciamento dos plasmídeos utilizados como molde para a produção de RNAm

Para padronizar a produção do RNA mensageiro e escolher a seqüência a ser utilizada em nossas experimentos, a principio foram utilizados dois RNAs mensageiros. O primeiro RNAm utilizado foi chamado RNAm-HSP65, esse RNAm foi produzido utilizando como molde o plasmídeo pcDNA3-HSP65 que contém todo o gene que codifica a proteína HSP65 de *Mycobacterium leprae* e 1500 pb adicionais não codantes, sendo o mesmo usado como vacina contra tuberculose. O segundo RNAm foi chamado de RNAm-hsp65-orf, este RNAm foi produzido a partir do plasmídeo pcDNA-HSP65-3A. Este plasmídeo por sua vez contém como somente a região de *open read frame* (ORF) do gene que codifica a proteína HSP65 de *Mycobacterium leprae*. Pode-se dizer que o inserto presente nesse plasmídeo não contém as regiões não traduzidas desse gene (UTR) tanto 5` quanto 3`.

Antes de iniciar os experimentos, a integridade dos plasmídeos foi verificada através da análise de restrição. A análise de eletroforese em gel de agarose mostrou que a digestão do pcDNA₃-Hsp65 (*Bam* H I e *Not* I) produziu duas bandas- uma de 5,4 kb, representando o vetor (pcDNA₃); e a outra de 3,3 kb representando todo o segmento gênico da Hsp65 juntamente com 1500 pares de base não transcritos (Figura 1, pista 5). A digestão do pcDNA-HSP65-3A (*Apa* I e *Bam* H I) também produziu duas bandas, correspondendo ao fragmento de 5,4 kb representando o vetor (pcDNA₃), e a de 1,8 kb, representando apenas o inserto da Hsp65, sem a porção não codificante (Figura 1, pista 8). Por outro lado o pcDNA₃ digerido (*Bam* H I) mostrou perfil eletroforético correspondente ao tamanho do vetor, com uma banda de 5,4 kb (Figura 1, pista 3). Cabe ressaltar que todas as amostras tiveram índices de endotoxina menores que 0,1 EU/μg de DNA, portanto aceitáveis para testes “*in vivo*”, como recomendado pela farmacopéia americana e européia.

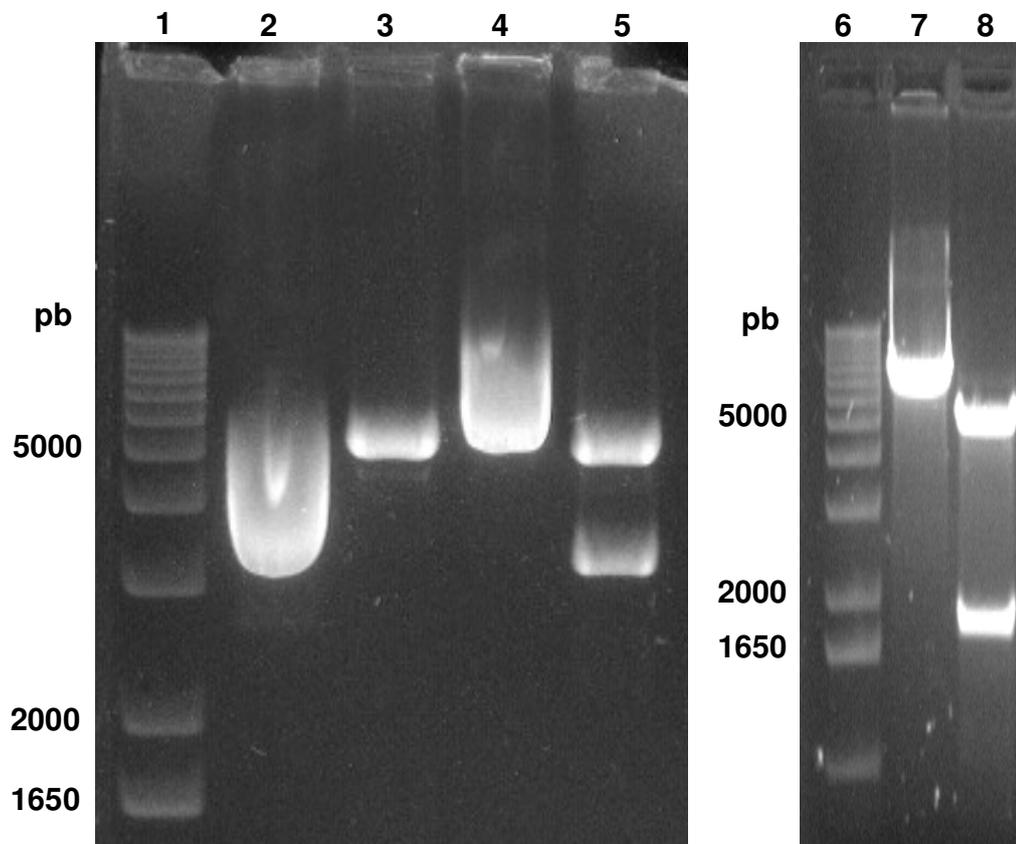


Figura 1. Perfil eletroforético dos plasmídeos pcDNA3, pcDNA3-Hsp65 e pcDNA-HSP65-3A. Após a digestão dos plasmídios com as respectivas enzimas de restrição, os fragmentos foram separados em gel de agarose e a presença dos fragmentos de DNA visualizadas pela coloração com brometo de etídeo. Canaletas 1 e 6: 1kb DNA *Ladder* (Invitrogen), utilizado como marcador de pares de base; Canaleta 2: pcDNA3 não digerido; Canaleta 3: pcDNA3 digerido com BamH I; Canaleta 4: pcDNA3-Hsp65 não digerido; Canaleta 5: pcDNA3-Hsp65 digerido com BamH I e Not I; Canaleta 7: pcDNA-HSP65-3A não digerido; Canaleta 8: pcDNA-HSP65-3A digerido com BamH I e Apa. Ao lado esquerdo da figura está representado o padrão de pares bases (pb) correspondente as canaletas 1 e 6.

A produção de RNAm sintético utilizado para a imunização nos protocolos vacinais requer diversas preocupações. A primeira informação crucial é a seqüência do plasmídeo utilizado como molde, visando identificar o sítio correto de iniciação e término. Para tanto, optamos por avaliar dois plasmídios, através do seqüenciamento do cDNA contidos em cada vetor para posterior confecção do RNAm. Como esses dois vetores são baseados em um mesmo esqueleto pcDNA3, foi possível desenhar *primers* para o seqüenciamento dos dois vetores. Os dois plasmídios apresentavam diferenças entre os seus insertos, isto é, o pcDNA3-HSP65 continha todo o gene da proteína HSP65 de *M. leprae* enquanto o segundo pcDNA-hsp65-3A continha apenas a ORF deste mesmo gene. Com isso os *primers* construídos para o seqüenciamento do primeiro inserto (todo o gene HSP65) foram úteis para o seqüenciamento do inserto presente também no plasmídeo pcDNA-hsp65-3A.

Considerando a qualidade do seqüenciamento, inferida pela análise feita no programa PHRAP, e mostrada a seguir nas análises *in silico*, pode-se dizer que os *primers* desenhados foram eficientes para cobrir o seqüenciamento desejado.

As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE HeathCare). Após o recebimento dos dados brutos do seqüenciamento, esses foram tratados e analisados utilizando a plataforma Phred-Phrap-Consed (Gordon, Abajian *et al.*, 1998). Os dados gerados a partir dessa análise foram avaliados utilizando a ferramenta Blast (Altschul, Gish *et al.*, 1990).

As análises de alinhamento pelo programa Blast2seq (Tatusova e Madden, 1999) e NEBCUTTER (Vincze, Posfai *et al.*, 2003) foram sempre realizadas utilizando as seqüências trimadas, isto é analisadas e otimizadas, pelo programa Phrap.

A partir dos *primers* construídos foi possível seqüenciar 89% da extensão dos insertos, resultando na geração de quatro *contigs*, correspondentes as seqüências dos dois insertos transcritos pelas duas fitas do DNA. Essa estratégia foi necessária para uma análise acurada das seqüências. Outro ponto importante foi a confirmação das extremidades dos insertos, para a confirmação da presença do ATG inicial ou, seqüência iniciadora da proteína, correspondente ao aminoácido metionina, e do códon de parada da leitura ribossomal, ou códon *stop*, como por exemplo, o TGA. As análises desses dados estão representadas nas figuras abaixo. A figura 2

mostra o resultado do Blastn contra o melhor *contig* gerado pelo seqüenciamento do plasmídeo pcDNA-hsp65-3A.

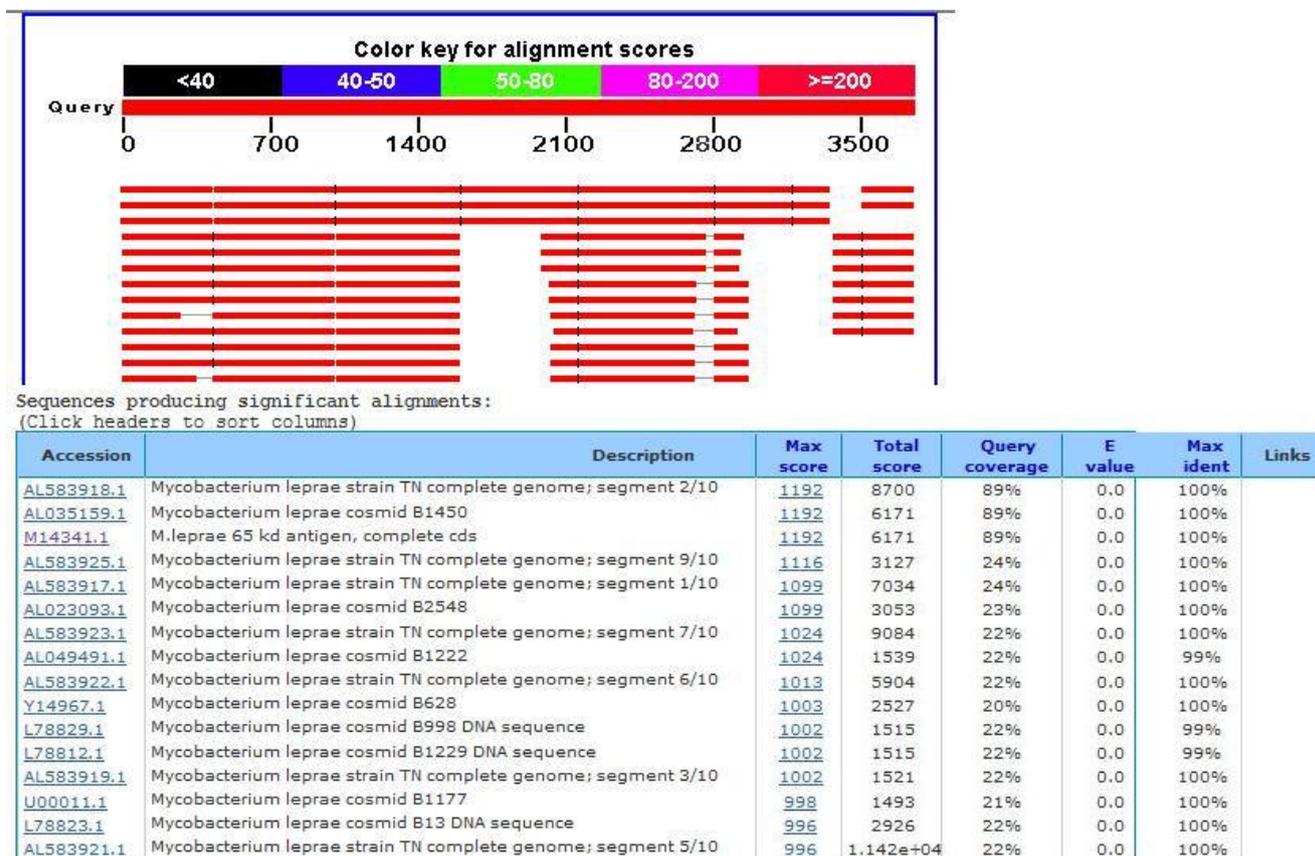


Figura 2. Screenshot resultado Blastn Contig pcDNA-hsp65-3A

Nessa figura é possível notar que o alinhamento gerado mostrou correspondência com as seqüências existentes para o gene que codifica a proteína HSP-65, particularmente os três primeiros resultados da análise. Os demais resultados não invalidam a escolha do melhor *contig* pois mostra alinhamento do mesmo com os cosmídeos que contém o genoma da *M.leprae* Para confirmar a seqüência obtida foi realizado outra análise de homologia usando o melhor *contig*, escolhido a partir dos quatro contigs gerados no seqüenciamento. Os dados obtidos estão representados na figura 3.

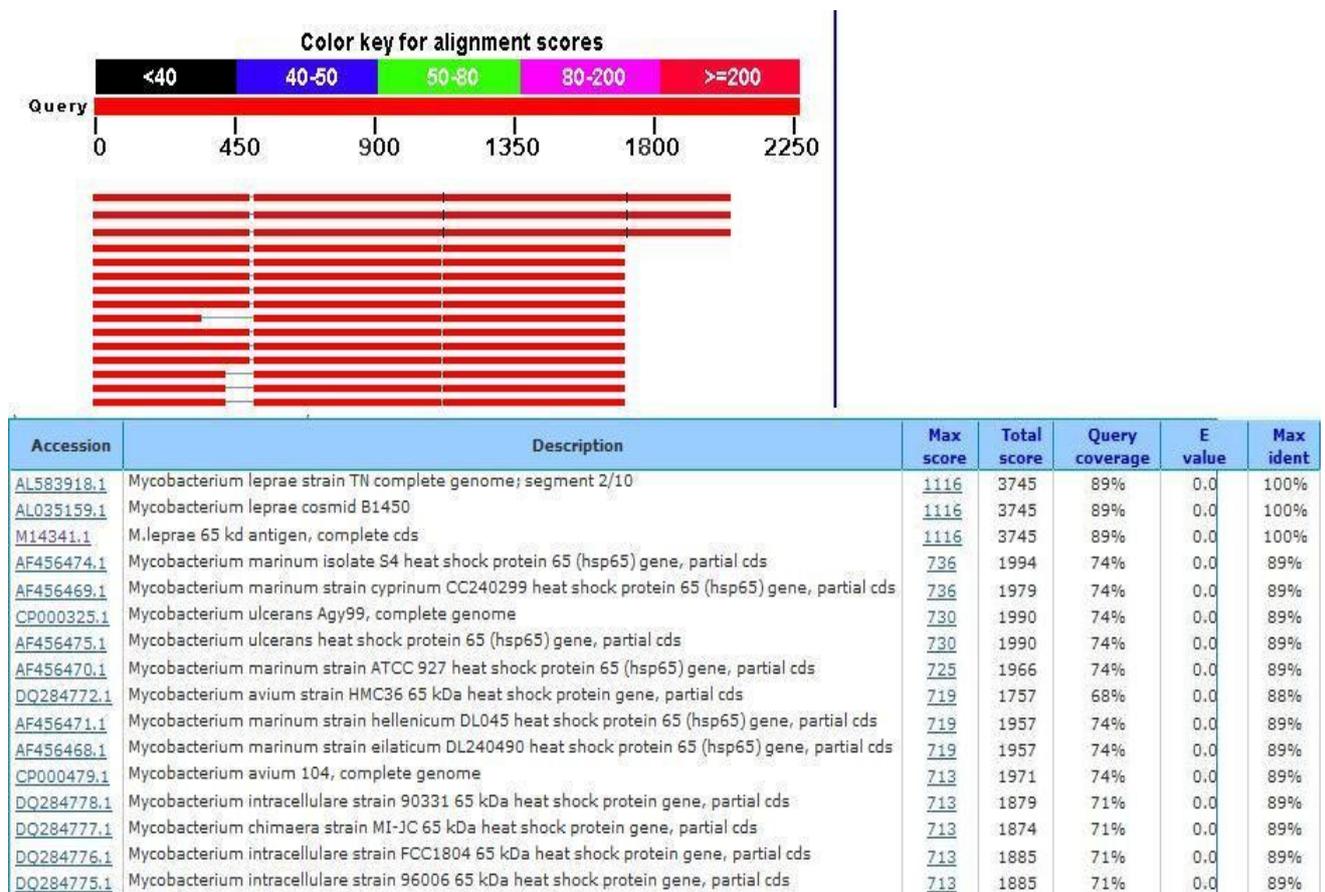


Figura 3. Screenshot resultado Blastn para o Contig gerado para o plasmídeo pcDNA-hsp65-3A

Como podemos observar na figura 3 o melhor *contig* obtido pela homologia em Blastn, continuou mostrando melhor alinhamento com o a seqüência de cDNA da hsp65 utilizada. Além disso, notamos que o tamanho desse inserto corresponde ao tamanho da ORF gerada no programa ORF *finder* contido no site do NCBI e mostrado na figura 4. Para essa análise todo o gene hsp-65 foi lançado no programa e este busca as prováveis ORFs contidas na seqüência analisada.

ORF Finder (Open Reading Frame Finder)

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

M.leprae 65 kd antigen, complete cds.

Program Database with parameters

View

Frame	from	to	Length
+3	207	1832	1626
-1	1622	2134	513
-1	854	1225	372
-1	197	562	366
-3	2166	2474	309
-1	2717	2968	252
+1	958	1176	219
+2	3398	3612	216
+3	3225	3422	198
+1	358	546	189

Length: 541 aa

```

207 atgccaagacaattgcgtagcgacgaagaggcccgtcgcggcctc
M A K T I A Y D E E A R R G L
252 gagcggggcttgaacagcctcgccgacgcggtaaagggtgacggtg
E R G L N S L A D A V K V T L
297 ggtccgaaggggcgcaacgtcggttctagagaagaagtgggtgct
G P K G R N V V L E K K W G A
1782 gcagctccggcgagcgaccgacccggtggcatgggtggtatggac
A A P A S D P T G G M G G M D
1827 ttctga 1832
F *

```

Figura 4. Screenshot do programa ORF Finder do NCBI mostrando a ORF dentro da seqüência total da proteína HSP65. Em azul número 207 corresponde ao ATG inicial da ORF e em rosa 1832 corresponde ao TGA stop códon.

Na figura 4 podemos identificar tanto o códon de iniciação da tradução ATG quanto o códon de parada TGA, e sua localização na ORF encontrada pelo programa. Esses três resultados confirmaram que nossos plasmídeos têm grande similaridade com as seqüências originais tanto para o gene inteiro da proteína Hsp65 quanto para sua ORF. Dado esse confirmado pelo E-Value igual a 0. Além disso não foi encontrada nenhuma mudança ou mutação nas seqüências, isto é, temos a seqüência correta do gene que usaremos no trabalho. Os gaps presentes nas duas seqüências são resultado da baixa qualidade de sequenciamento obtida nas extremidades das seqüências. O próximo resultado obtido foi a confirmação das extremidades dos dois plasmídeos onde estão presentes tanto o sítio de iniciação quanto o de terminação da tradução da proteína codificada pelos mesmos. Para isso utilizamos o programa Blast2seq, também contido no site do NCBI, sempre alinhando a a melhor seqüência gerada para os *primers* correspondentes com as extremidades dos plasmídeos, sendo ela na orientação forward ou reverse, com a seqüência original da Hsp65 e também do vetor pcDNA3. Primeiramente serão exibidos os dados para o plasmídeo pcDNA3-HSP65. A figura 5 mostra o alinhamento da seqüência proveniente do *primer* R1 com a seqüência do gene hsp65. A seqüência presente na posição 519 indica a presença da seqüência de iniciação de tradução ATG do início da ORF do gene hsp65.

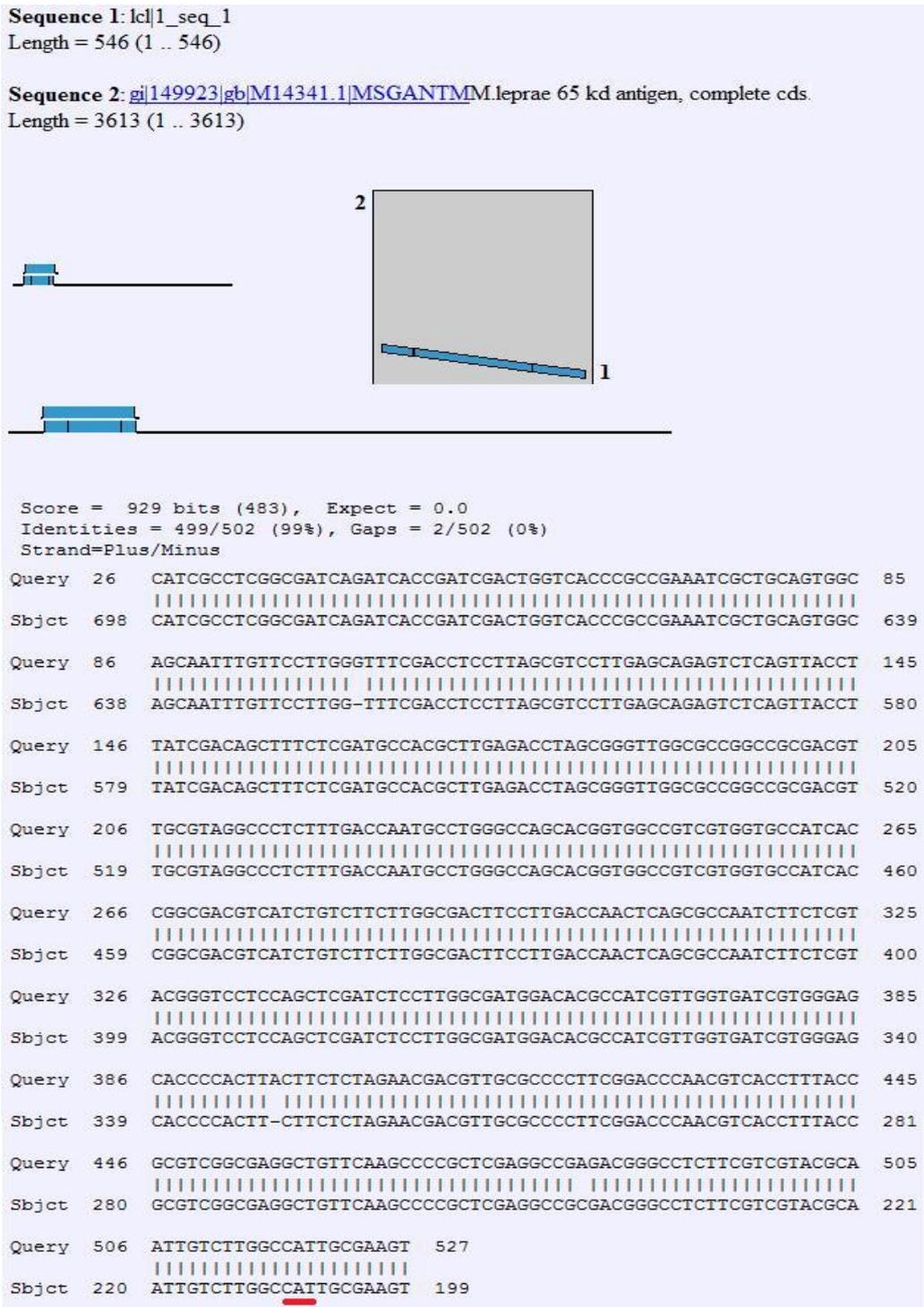


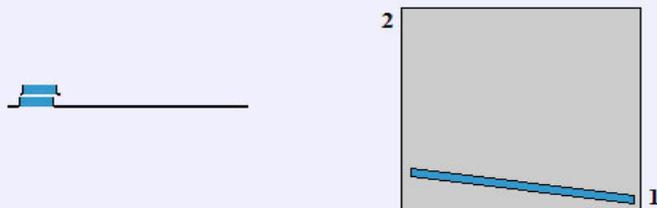
Figura 5. Screenshot Blast2Seq *Primer R1* do plasmídeo pcDNA3-HSP65 alinhado com a sequência total da HSP65. Linha vermelha indica a posição 199 correspondente ao ATG inicial da ORF do gene hsp65.

Essa figura nos mostra a extremidade 3'UTR do gene hsp65, comprovando que esse inserto contém todo o gene hsp65. No caso deste plasmídeo não foi necessário mostrar a seqüência TGA- códon de parada da tradução- pois a mesma foi confirmada pela similaridade mostrada na figura 2.

Para o plasmídeo pcDNA-HSP65-3A foram realizadas as mesmas análises. A figura 7 confirma a presença da seqüência ATG, códon de iniciação da tradução, e a figura 8 mostra a presença da seqüência TGA, códon de finalização da tradução.

Sequence 1: lc|1_seq_1
Length = 538 (1 .. 538)

Sequence 2: lc|2_seq_2
Length = 3613 (1 .. 3613)



NOTE:Bitscore and expect value are calculated based on the size of the nr database.

NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence.



```
Score = 962 bits (500), Expect = 0.0
Identities = 500/500 (100%), Gaps = 0/500 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 204 GCGTAGGCCCTCTTTGACCAATGCCTGGGCCAGCACGGTGGCCGTGCGTGGTGCCATCACC 263
          |||
Sbjct 518 GCGTAGGCCCTCTTTGACCAATGCCTGGGCCAGCACGGTGGCCGTGCGTGGTGCCATCACC 459

Query 264 GGCGACGTCATCTGTCTTCTTGGCGACTTCCTTGACCAACTCAGCGCCAATCTTCTCGTA 323
          |||
Sbjct 458 GGCGACGTCATCTGTCTTCTTGGCGACTTCCTTGACCAACTCAGCGCCAATCTTCTCGTA 399

Query 324 CGGGTCCTCCAGCTCGATCTCCTTGGCGATGGACACGCCATCGTTGGTGATCGTGGGAGC 383
          |||
Sbjct 398 CGGGTCCTCCAGCTCGATCTCCTTGGCGATGGACACGCCATCGTTGGTGATCGTGGGAGC 339

Query 384 ACCCCACTTCTTCTCTAGAACGACGTTGCGCCCCTTCGGACCCAACGTCACCTTTACCGC 443
          |||
Sbjct 338 ACCCCACTTCTTCTCTAGAACGACGTTGCGCCCCTTCGGACCCAACGTCACCTTTACCGC 279

Query 444 GTCGGCGAGGCTGTTCAAGCCCCGCTCGAGGCCGCGACGGGCTCTTCGTCGTACGCAAT 503
          |||
Sbjct 278 GTCGGCGAGGCTGTTCAAGCCCCGCTCGAGGCCGCGACGGGCTCTTCGTCGTACGCAAT 219

Query 504 TGTCTGGCCATTGCGAAGT 523
          |||
Sbjct 218 TGTCTGGCCATTGCGAAGT 199
```

Figura 7. Screenshot Blast2Seq *Primer R1* do plasmídeo pcDNA-HSP65-3A alinhado com a seqüência total do gene hsp65. A Linha vermelha indica a posição 512 correspondente ao ATG inicial da ORF desse gene nesse segmento de seqüenciamento.

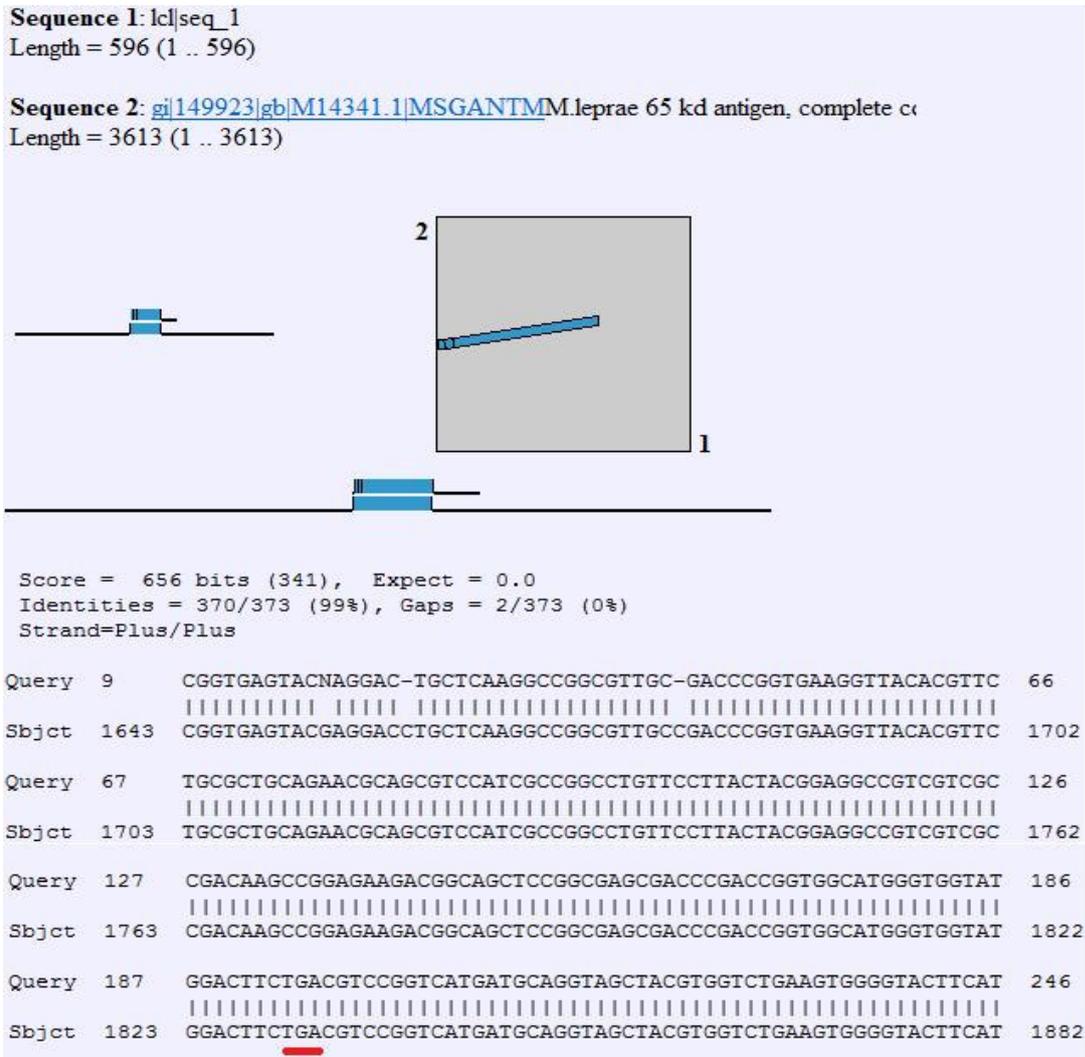


Figura 8. Screenshot Blast2Seq *Primer* F4 do plasmídeo pcDNA-HSP65-3A alinhado com a seqüência total da HSP65. Linha vermelha indica a posição 1827 correspondente ao TGA final da ORF da proteína (stop códon).

Na figura 8 podemos notar que a seqüência TGA está posicionada exatamente em sua posição de origem, confirmado pelo alinhamento entre as seqüências analisadas.

Outro dado importante obtido dessas análises *in silico* foi o exato ponto de clonagem desse inserto. Para essa análise utilizamos tanto a estratégia de digestão com enzimas de restrição *in vitro*, quanto as análises *in silico*, isto é, utilizando softwares desenvolvidos para simular a função das enzimas de restrição. É necessário dizer que já é conhecida a existencia de somente um sítio de restrição para a enzima *Xba* I no gene *hsp65* que está posicionado exatamente 114 pares de bases (pb) depois do sítio ATG e que não existe um sítio de restrição para enzima *Bam* HI neste mesmo gene. Porém, no vetor pcDNA3 existe um sítio tanto para *Bam* HI quanto para *Xba* I. Dessa forma, quando é realizada a dupla digestão desses plasmídeos é possível confirmar a posição da clonagem destes insertos. Na figura 9 é mostrada essa análise de dupla digetão para a seqüência obtida com o *primer* R1 para o plasmídeo pcDNA3-HSP65 e a mesma análise para o plasmídeo pcDNA-hsp65-3A.

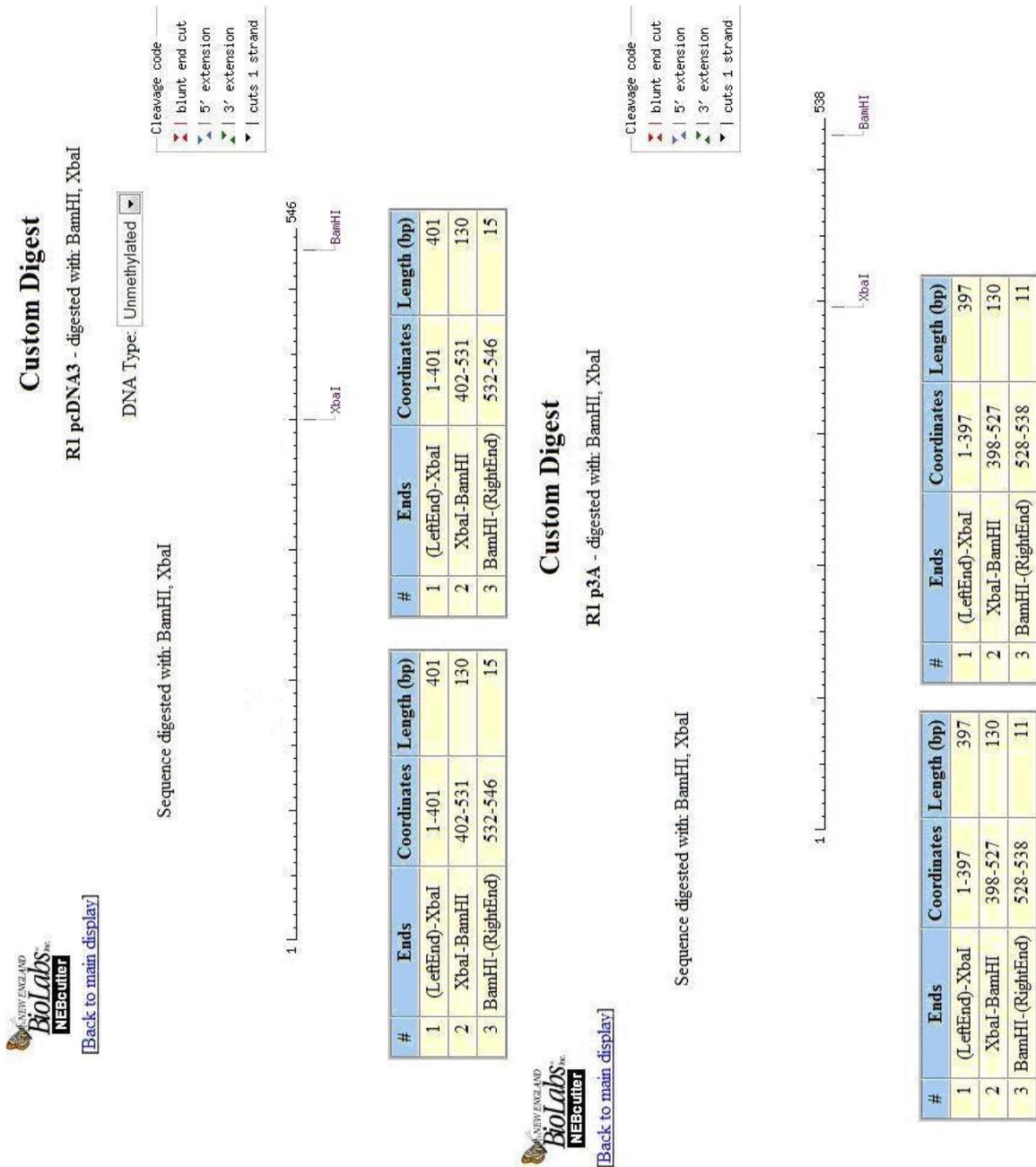


Figura 9. Digestão *in silico* do segmento gerado pelo *primer* R1 no seqüenciamento do plasmídeo pcDNA-hsp65-3A e pcDNA3-HSP65 com as enzimas *Xba* I e *Bam* HI, sendo o sítio para a enzima *Bam* HI presente na posição 528 desta seqüência exatamente a 16 pb depois do sítio ATG mostrado na figura anterior.

Nessa figura podemos constatar que o fragmento do seqüenciamento gerado com *primer* R1, desenhado propositalmente para mostrar a transição do inserto com o vetor, contém tanto o sítio para a enzima *Xba*I contido no gene *hsp65* quanto o sítio para a enzima *Bam* HI contido no vetor pcDNA3. Se relacionarmos a distância do sítio de *Xba* I com a posição ATG que é de 114 pb com a distancia do sitio de *Xba* I em relação ao sitio de *Bam* HI que é de 130 pb podemos inferir que o sitio ATG está a 16 pb do sítio de clonagem. Essa informação foi de grande importância para a confecção do RNAm *in vitro*. A partir dos dados obtidos foi possível encontrar a distância do sítio ATG em relação ao sítio de ancoragem da enzima T7 RNA polimerase, cuja ligação ao DNA se localiza a exatos 30 pb do sitio de *Bam* HI no vetor pcDNA3. Os dados da dupla digestão foram confirmados experimentalmente como pode ser visualizado na figura 10. Podemos observar, primeiramente, o tamanho dos insertos liberados pela dupla digestão com aproximadamente 1800 pb para o fragmento contido no plasmídeo pcDNA-hsp65-3A e de 3200 pb contido no plasmídeo pcDNA3-HSP65 ambos liberados do vetor pelos sitios das duas enzimas. Além disso, podemos notar um fragmento de aproximadamente 100 pb gerado pelos sitios das duas enzimas, presente uma no vetor e a outra no inserto, confirmando a digestão *in silico*.

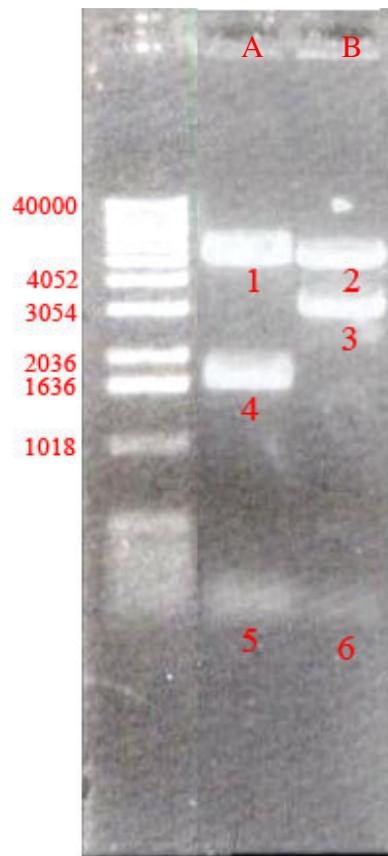


Figura 10. Perfil eletroforético dos plasmídeos, pcDNA3-Hsp65 e pcDNA-hsp65-3A, após a digestão dos mesmos com as enzimas *Xba* I e *Bam* HI, os fragmentos foram separados em gel de agarose e a presença dos fragmentos de DNA visualizadas pela coloração com brometo de etídeo. As amostras foram submetidas a gel de agarose 1% e as bandas visualizadas pela coloração com brometo de etídeo.. Pista (A) Plasmídeo pcDNA3-hsp65; pista (B) Plasmídeo 3A. Os números correspondem a: 1-Vetor pcDNA3, 2 -pcDNA3, 3-Inserto ORF HSP65 4-Inserto Gene completo HSP65, 5-Fragmento *Xba* I *Bam*HI, 6 Fragmento *Xba* I *Bam*HI. A esquerda da figura esta indicado o valor de pb expressos em quilobases (KB).

4.2 Confeção do RNAs mensageiros e análise de sua estrutura molecular

A confeção dos RNAs mensageiros (RNAm-Hsp65 e) foi realizada utilizando-se o Kit mMESSAGE mMACHINE[®] T7 Ultra (Ambion) (item 3.5, do material e método) e analisado por eletroforese (Figura 11). Podemos observar que o RNAm-Hsp65 obtido mostrou um perfil eletroforético correspondente a uma banda de aproximadamente 3 kb (Figura 11, pista 2), e o uma banda de aproximadamente 1,9 kb (Figura 11, pista 3 e 4). A amostra também foi submetida a tratamento com RNase A, o que aboliu a presença da banda, confirmando a confeção da molécula de RNA mensageiro (figura 11a, pista 4). Outro aspecto para a confeção de um RNA eucariótico inclui a adição do adição CAP (7- metilguanosina) na extremidade 5' e cauda poli-A na extremidade 3' do RNAm, Em nosso modelo, a adição da cauda poli-A resultou em um aumento de aproximadamente 50 pares de base, gerando, assim, um RNA mensageiro pronto a ser traduzido em uma célula eucariótica, uma vez que a presença do sítio CAP e da cauda poli-A são fundamentais para a tradução do RNA mensageiro nas células eucarióticas. Essa adição de cauda poli-A pode ser verificada na figura 11 comparando a diferença de tamanho entre os fragmentos das pistas 3 e 4, onde na pista 3 está representado o RNAm produzido antes da reação de poli-adenilização. Todas as moléculas de RNAm produzidos tiveram índices de endotoxina menores que 0,1 EU/ μ g de RNAm, portanto aceitáveis para testes “*in vivo*”, como recomendado pela farmacopéia americana e européia.

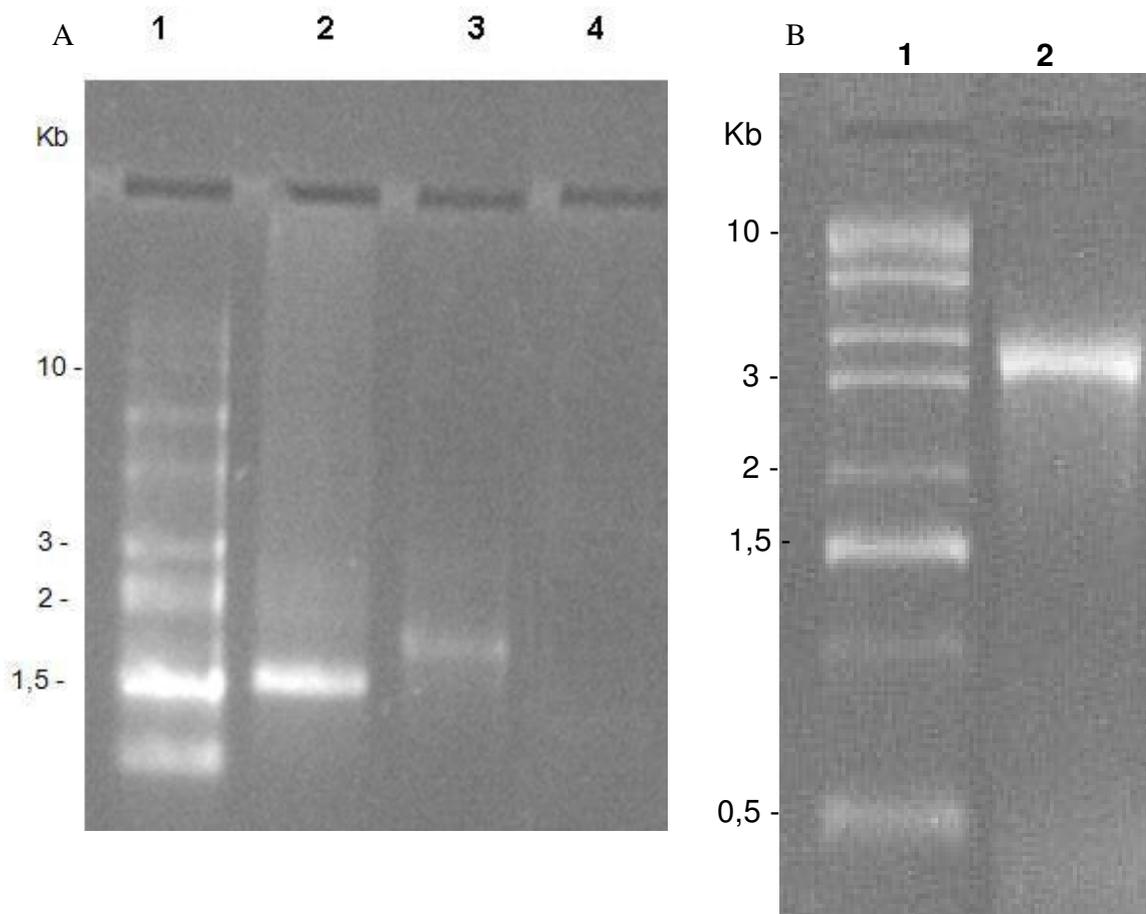


Figura 11. Perfil eletroforético dos RNAs mensageiros (RNAm-Hsp65 e RNAmhsp65-ORF). A eletroforese foi realizada em gel de agarose denaturante 1,5% corado com brometo de etídio. Gel - A- Canaleta 1 : 0,5-10 kb RNA Ladder (Invitrogen), utilizado como marcador de pares de base; Canaleta 3 : s/polyA Canaleta 4: c/polyA. Canaleta 5: após tratamento com RNase. Gel - B - Canaleta 1 : 0,5-10 kb RNA Ladder (Invitrogen), utilizado como marcador de pares de base. Canaleta 2: RNAm-Hsp65;

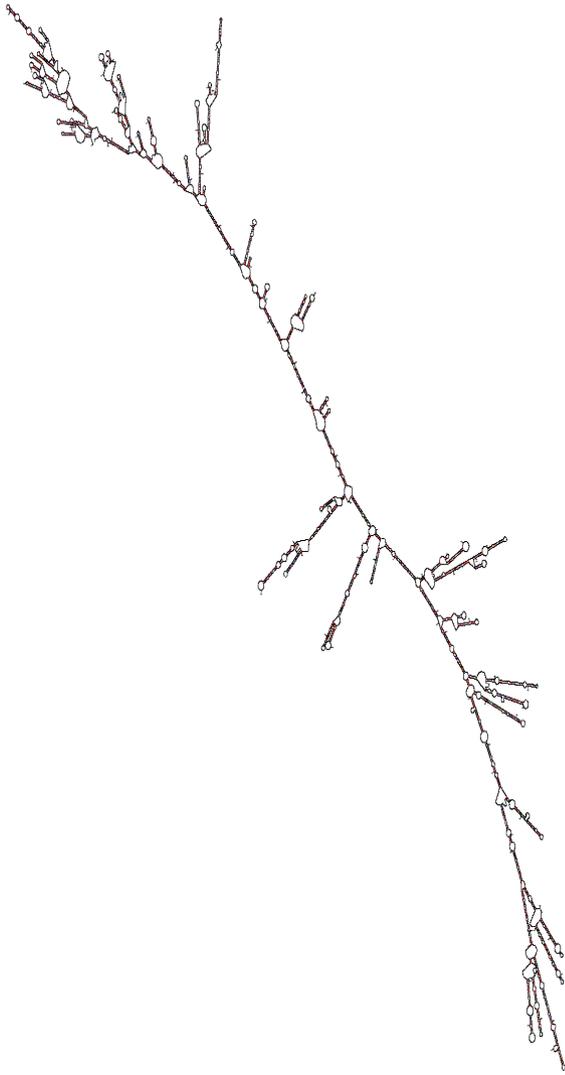
Os resultados acima nos mostraram que a partir de uma seqüência de cDNA procariótica da hsp65 foi possível confeccionar os RNAmhsp65-ORF com características eucarióticas. O tratamento com RNAase A aboliu a presença da banda, sugerindo que a molécula produzida era um RNA (figura 11 A canaleta 4).

Desde que a estrutura das moléculas de RNA possam interferir em prováveis interações a receptores celulares, ou apresentar diferenças na estabilidade, optamos por realizar uma análise da estrutura molecular de ambos os RNAs mensageiros. Os resultados demonstraram que havia uma diferença considerável entre eles, tanto na estrutura quanto no valor da energia livre (Figura 12), sendo que o RNAm-Hsp65 liberou uma quantidade maior de energia quando comparado com o RNAmhsp65-ORF (dG: - 1511 e dG: - 682, respectivamente). Este dado está diretamente relacionado com a estabilidade do RNA mensageiro, ou seja, o RNAmhsp65-ORF possui uma estabilidade maior do que o RNAm-Hsp65. Acreditamos que o tamanho dos RNAs mensageiros reflete na estabilidade dos mesmos, assim o RNAm-Hsp65 com 3 kb possui uma estabilidade menor do que o RNAmhsp65-ORF que possui 1,8 kb.

Conforme mencionado anteriormente, o tamanho de 3 kb do RNAm-Hsp65 não era esperado, pois acreditava-se que a enzima T7 polimerase interromperia o processo na seqüência de parada presente no inserto da Hsp65, gerando assim um RNA mensageiro de 1,8 Kb, ou seja, um RNA mensageiro referente apenas ao segmento gênico da Hsp65, sem os 1,5 Kb não transcritos presentes no pcDNA3-Hsp65 (3,3 Kb - Figura 1, pista 5). Por outro lado, para o RNAmhsp65-ORF, o tamanho obtido foi conforme o esperado, uma vez que o plasmídeo *template* pcDNA-hsp65-3A contém apenas o segmento gênico da Hsp65.

A

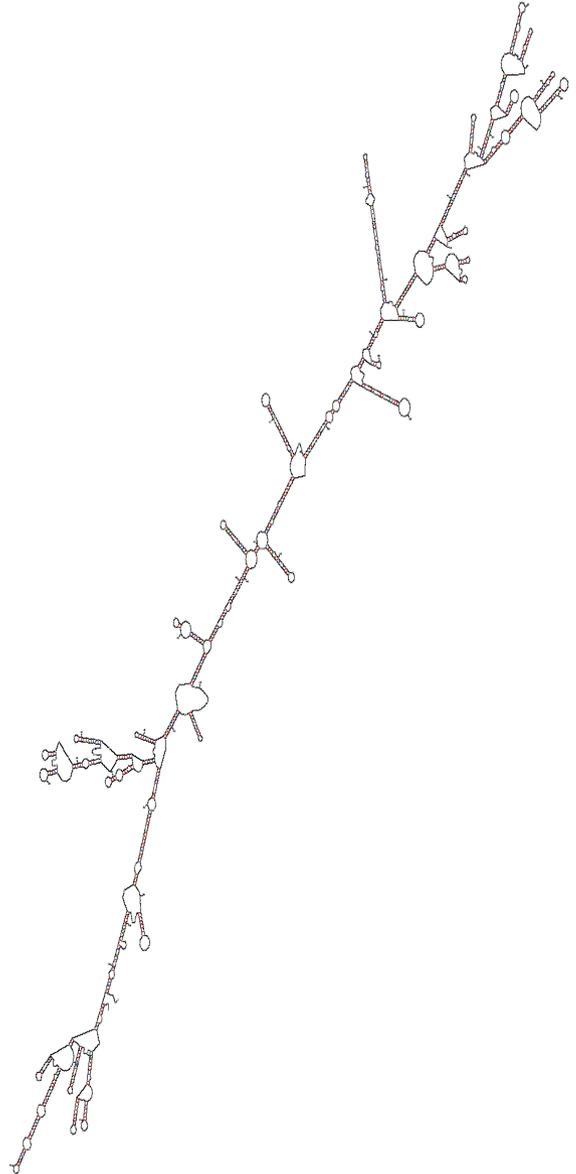
Output of sir_graph
by D. Stewart and M. Zuker



dG = -1511.19 [initially -1604.30] hsp_RNA_first

B

Output of sir_graph
by D. Stewart and M. Zuker



dG = -682.13 [initially -731.40] RNA_seq541aa_30/01

Figura 12. Análise da estrutura molecular dos RNAs mensageiros codificando a proteína Hsp65 de *M. leprae* (A: RNAm-Hsp65 e B: RNAm-hsp65-ORF) . A análise da estrutura molecular dos RNAs mensageiros foi realizada utilizando-se o programa Mfold. dG: energia liberada.

Posteriormente a análise da estrutura molecular de todo a RNAm a ser produzida, optamos por realizar a estrutura molecular da região 5' UTR presente em ambos RNAs testados (experimentos realizados colaboração com a aluna de Iniciação científica Renata Ariza Rosseti, projeto FAPESP número 2007/00234-0). A estrutura é a mesma pois ambos compartilham uma pequena seqüência de DNA entre o promotor T7 da enzima RNA polimerase e o ATG inicial do gene hsp65. Essa avaliação é importante pois nessa região podem existir estruturas moleculares como *hairpins* e *loops* que podem ter influencia crucial no controle de expressão gênica pós-transcricional (Kozak, 1986), (Helke, Geisen *et al.*, 1993), (Babendure, Babendure *et al.*, 2006). Essa influência depende do tamanho, da estabilidade e também da posição dessas estruturas em relação ao sítio de iniciação da tradução. Como pode ser visualizado na figura 13 essa estrutura tem um dG -17,20 e uma estrutura com apenas um *hairpin* que está distante 18 bases do sítio de iniciação da tradução.

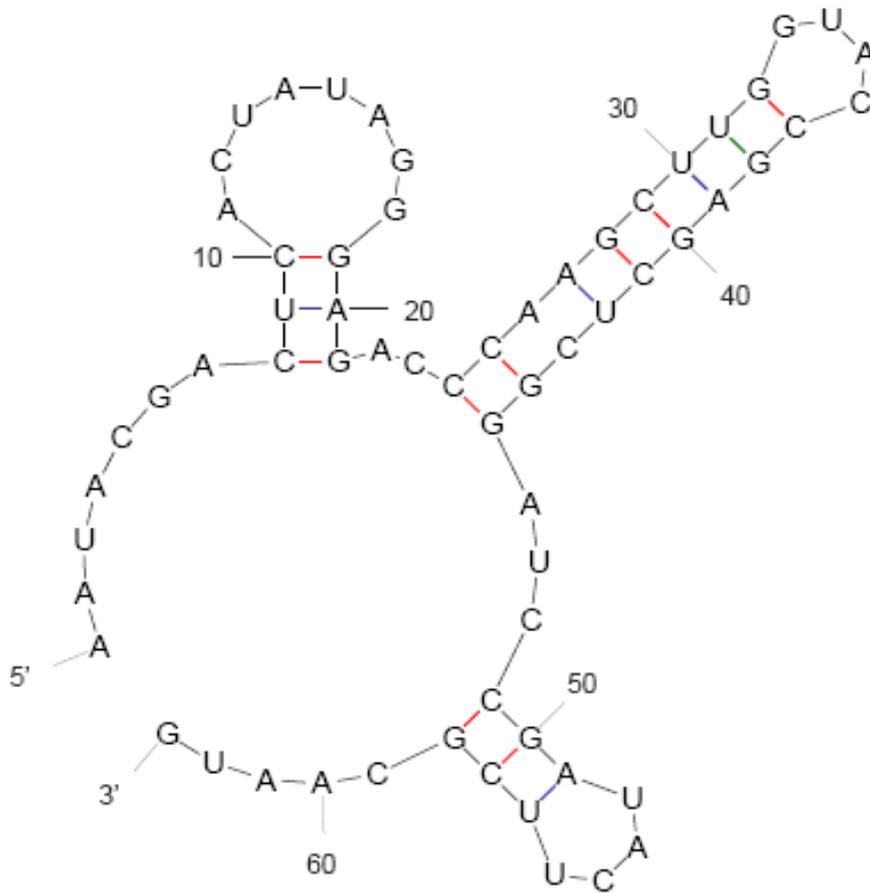


Figura 13. Análise da estrutura molecular da região 5`UTR dos RNAs mensageiros codificando a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. A análise da estrutura molecular dos RNAs mensageiros foi realizada utilizando-se o programa Mfold. dG: energia liberada.

4.2.1 Avaliação da integridade do RNAm-hsp65-ORF após diferentes tempos de incubação do mesmo com células HEK293.

A fim de avaliar a integridade do RNAmhsp65-ORF após o contato com células, usamos a transfecção do mesmo em células HEK293 como modelo. Foi realizado um RT-PCR a partir do RNA total extraído dessas células após diferentes tempos desse contato. Como mostrado na figura 14 existe uma banda específica para o RNAm da hsp65 apenas nas células que receberam RNAmhsp65-ORF denotando a especificidade dos *primers* desenhados. Além disso essa banda mostrou-se com um tamanho esperado (400 pb) comprovado pelo padrão de pares de base e pela banda presente na canaleta que mostra o resultado do RT-PCR usando como molde o plasmídeo pcDNA-hsp65-3A. Na figura 14 é possível verificar que o RNAmhsp65-ORF continua integro até 4 horas após o contato com as células. Porém oito após horas não foi mais possível se detectar a mensagem para a hsp65, sugerindo que o RNA esteja sendo traduzido. No entanto, não podemos descartar que parte da molécula esteja sendo degradada pela vias de controle de expressão da célula. Baseado nesses dados, podemos sugerir que após a penetração na célula, *in vivo*, a molécula de RNAm se mantém íntegra por um período de 4 horas, podendo ser traduzido em proteína como mostrado na figura 15.

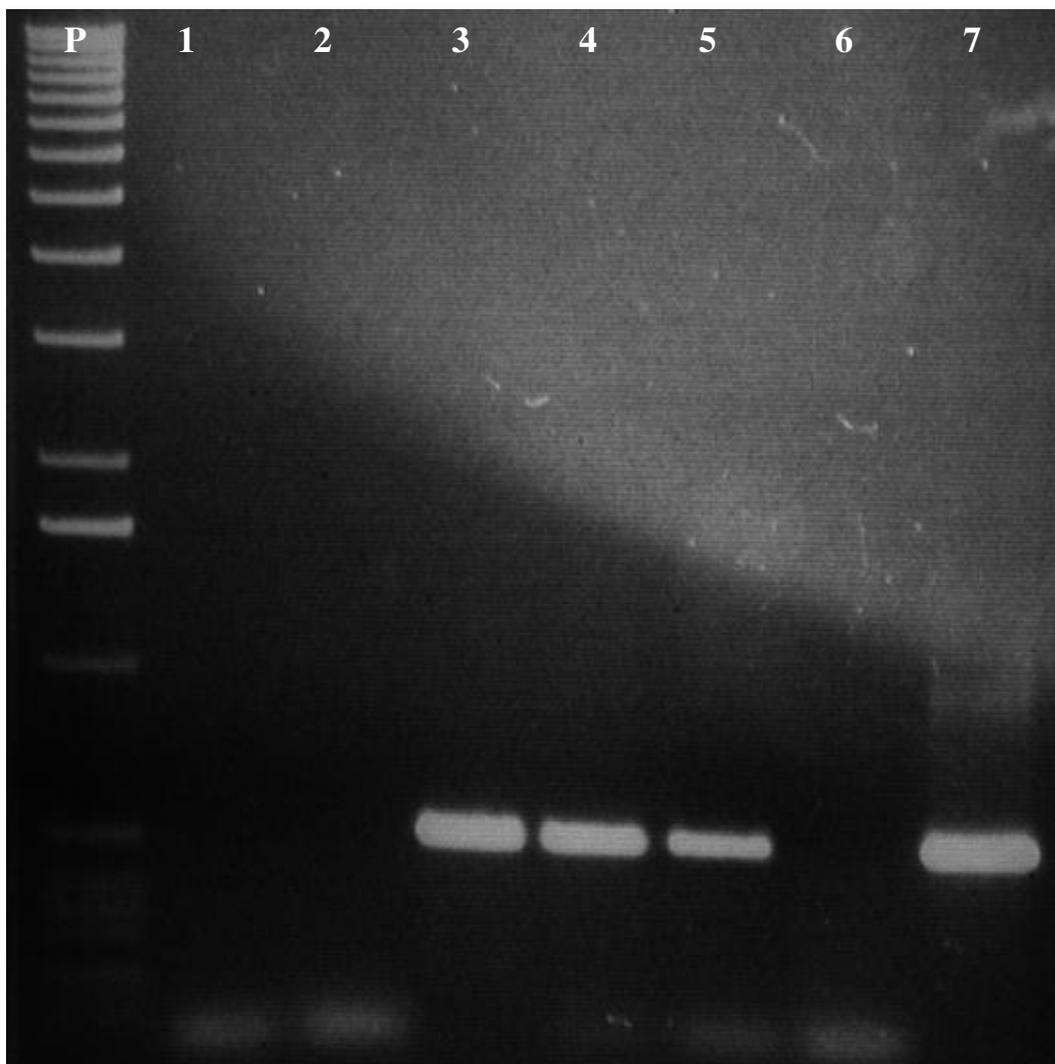


Figura 14. Detecção da integridade do RNAm-hsp65-ORF por RT-PCR.

Após a transfecção das células HEK 293 com o RNAm-hsp65-ORF as células foram mantidas em cultura por diferentes períodos de tempo para análise da presença do RNAmhsp65-ORF por RT-PCR. O RT-PCR foi realizado em culturas celulares após 30 minutos (canaleta 3) 2 horas (canaleta 4), 4 horas (canaleta 5), 8 horas (canaleta 6). A canaleta 7 o controle positivo do RT-PCR usando o plasmídeo pcDNA3-A como molde para RT-PCR. A canaleta 1 mostra a reação sem a adição de cDNA e a canaleta 2 mostra a reação que usou cDNA proveniente de células que não receberam o RNAm-hsp65-ORF. As bandas foram visualizadas em gel de agarose 1,5% após corrida eletroforética e corado com brometo de etídeo.

4.2.1 Avaliação da produção da proteína hsp65 codificada pelo RNAm-hsp65-ORF.

Para avaliar a produção da proteína hsp65 codificada pelo RNAm-hsp65-ORF foi realizado um Western Blot para a detecção da mesma usando anticorpos hsp65-epítipo-específico. Pela análise da figura 15 é possível detectar a que expressão da proteína ocorre a partir de 30 minutos do contato das célula HEK 293 com o RNAm-hsp65-ORF e essa produção perdura por 4 horas após o contato. Como mostrado na figura 15, nosso anticorpo reconhece uma banda apenas nos tempos citados, mostrando que essa produção não é compartilhada pelas células que não entraram em contato com o RNAmhsp65-ORF. Além disso, essa banda tem um tamanho esperado (~65kD) comprovado pelo padrão de peso molecular e pela banda reconhecida na canaleta que contém apenas proteína hsp65 recombinante como controle positivo.

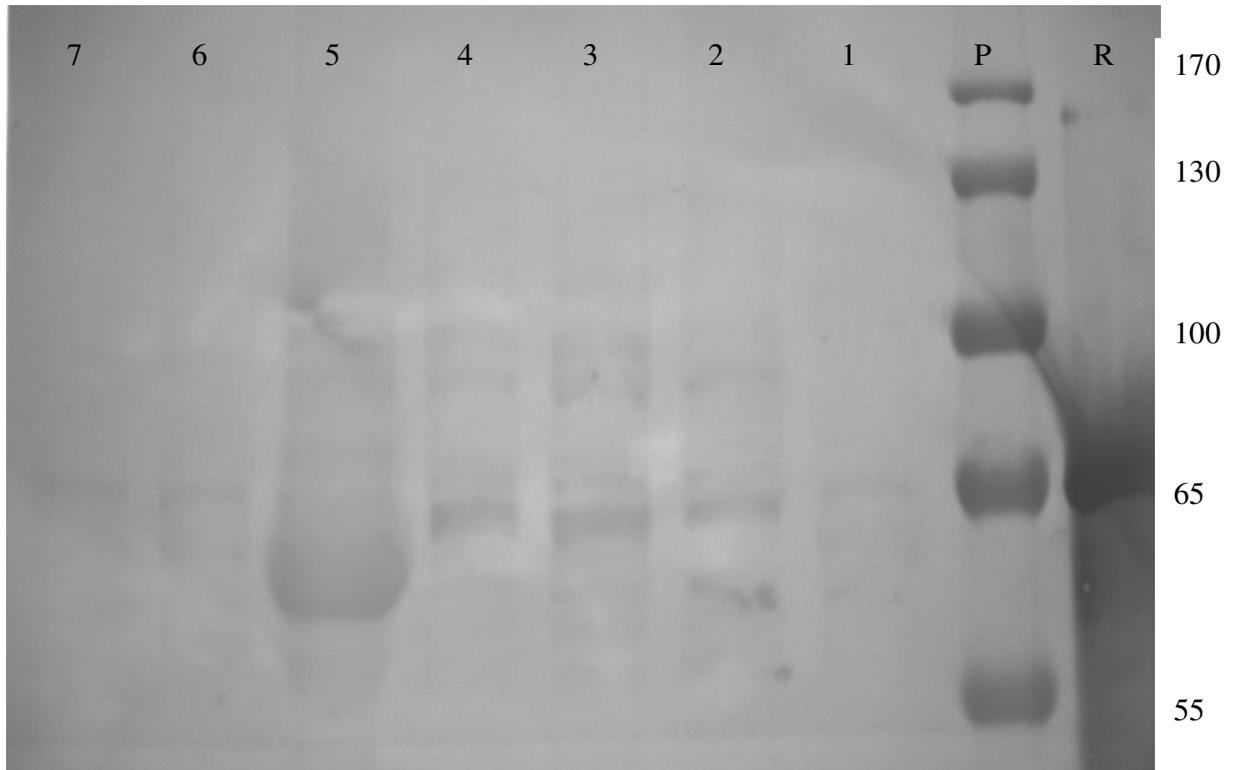


Figura 15. Após contato do RNAm-hsp65-ORF por diferentes períodos de tempo, o lisado total celular foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% e as bandas eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e encubadas com anticorpo anti-hsp65 por 2 horas. A reação foi revelada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo na presença de DAB. A canaleta P indica o padrão de peso molecular e os números fora da figura indicam o peso molecular das respectivas bandas do padrão, a canaleta R mostra a proteína hsp65 recombinante. A cinética da expressão da proteína foi realizada em 30 minutos (canaleta 2), 2 horas (canaleta 3), 4 horas (canaleta 4), 8 horas (canaleta 5), 12 horas (canaleta 6) e 24 horas (canaleta 7). A canaleta 1 mostra o mesmo procedimento para células que não receberam o RNAm-hsp65-ORF

4.3 Avaliação da resposta imune humoral e celular da vacina administrada por via intramuscular.

4.3.1 Produção de anticorpos anti-HSP65

Inicialmente avaliamos a produção de anticorpos específicos contra a proteína alvo de nosso estudo quinze dias após a última dose da injeção de RNAm-hsp65-ORF pela via intramuscular. Os isotipos analisados foram IgG2A e IgG1, característicos do padrão Th1 e Th2 respectivamente. Como pode ser analisado na figura 16 a imunização com o RNAmhsp65-ORF não induziu uma produção significativa de ambos anticorpos. Somente a imunização com BCG gerou uma produção estatisticamente significativa de anticorpos do tipo IgG1 anti-hsp65 o que tende a um padrão Th2 de resposta imune. No entanto, a produção de IgG2A também se mostrou elevada no grupo BCG. Esses dados sugerem que a vacinação com RNAm-hsp65-ORF pela rota intramuscular não induziu a produção de anticorpos dos isotipos analisados.

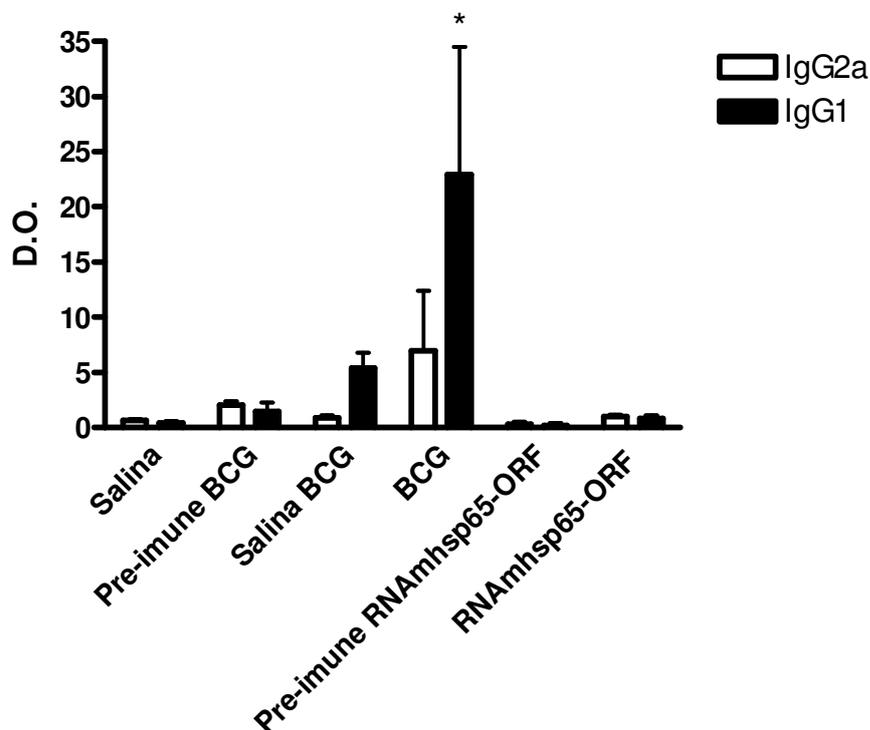


Figura 16. Determinação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2A anti-hsp65.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intramuscular com 40 ug do RNAm-hsp65-ORF em 3 doses com intervalos de 15 dias. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu salina. O soro foi coletado no primeiro dia do experimento (Pré-Imune) e após 15 dias da última imunização. Os níveis de anticorpos anti-hsp65 foram determinados por ELISA e os resultados são representados pelo valor da Densidade Óptica. As leituras foram realizadas a 490nm e as amostras foram diluídas de 10 a 1000 vezes. A diferença estatística foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.3.2 Proliferação de células totais do baço de animais vacinados por via intramuscular com RNAm-hsp65-ORF.

A avaliação da capacidade proliferativa de células T, obtidas do baço de animais vacinados com RNAm-hsp65-ORF foi realizada após o cultivo dessas células em contato com a proteína HSP65 recombinante (rHSP65). Como controle positivo para experimento utilizamos um estímulo policlonal, a Concanavalina-A (Con-A). A figura 17 mostra que somente os animais imunizados com BCG foram capazes de gerar células T que proliferaram frente ao estímulo específico. Pode-se notar, porém, que todos os animais tinham células viáveis, capazes de proliferar como visto nos gráficos que representam a proliferação frente ao estímulo Con-A. Esses resultados mostram que a vacinação com RNAm-hsp65-ORF não foi capaz de induzir níveis detectáveis de proliferação de linfócitos T no período analisado.

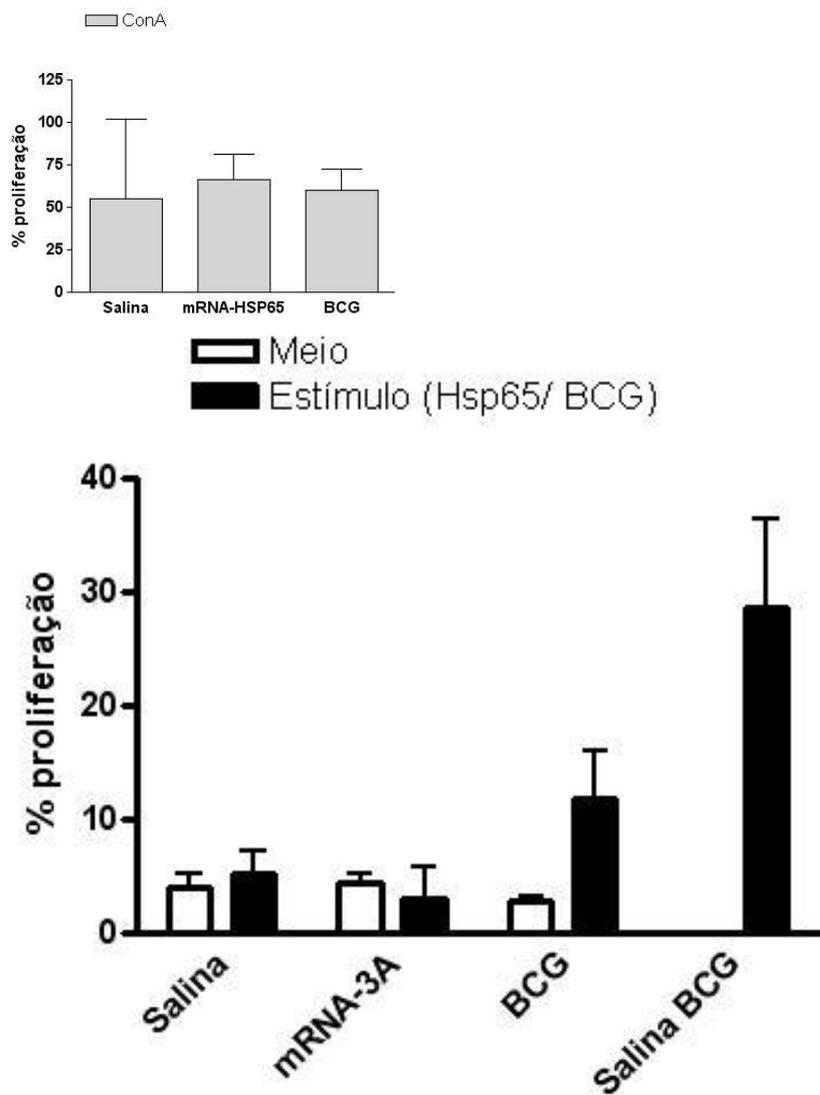


Figura 17. Determinação da atividade proliferativa.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intramuscular com 40ug de RNAm-hsp65-ORF em 3 doses com intervalos de 15 dias. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu salina. Quinze dias após a última imunização os animais foram sacrificados e seus baços foram extraídos para a avaliação da atividade proliferativa através do ensaio de CFSE, após o estímulo *in vitro* com rhsp65 ou BCG ou Com-A. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.3.3 Produção de citocinas por células totais do baço de animais vacinados por via intramuscular com RNAm-hsp65-ORF.

A avaliação da capacidade imunoestimulatória do RNAm-hsp65-ORF foi avaliada também pela quantificação da produção de determinadas citocinas (IFN- γ , IL12 e IL10). Estes experimentos foram realizados 15 após a última imunização utilizando-se células totais provenientes de baços de animais imunizados após posterior re-estimulo *in-vitro* com rHSP65 ou Com-A.

Apenas as células provenientes do baço de animais imunizados com BCG foram capazes de produzir níveis significativos de IFN- γ (Fig-18) IL12 (Fig-19) e IL10 (Fig-20) em relação aos controles e a nossos grupos experimentais.

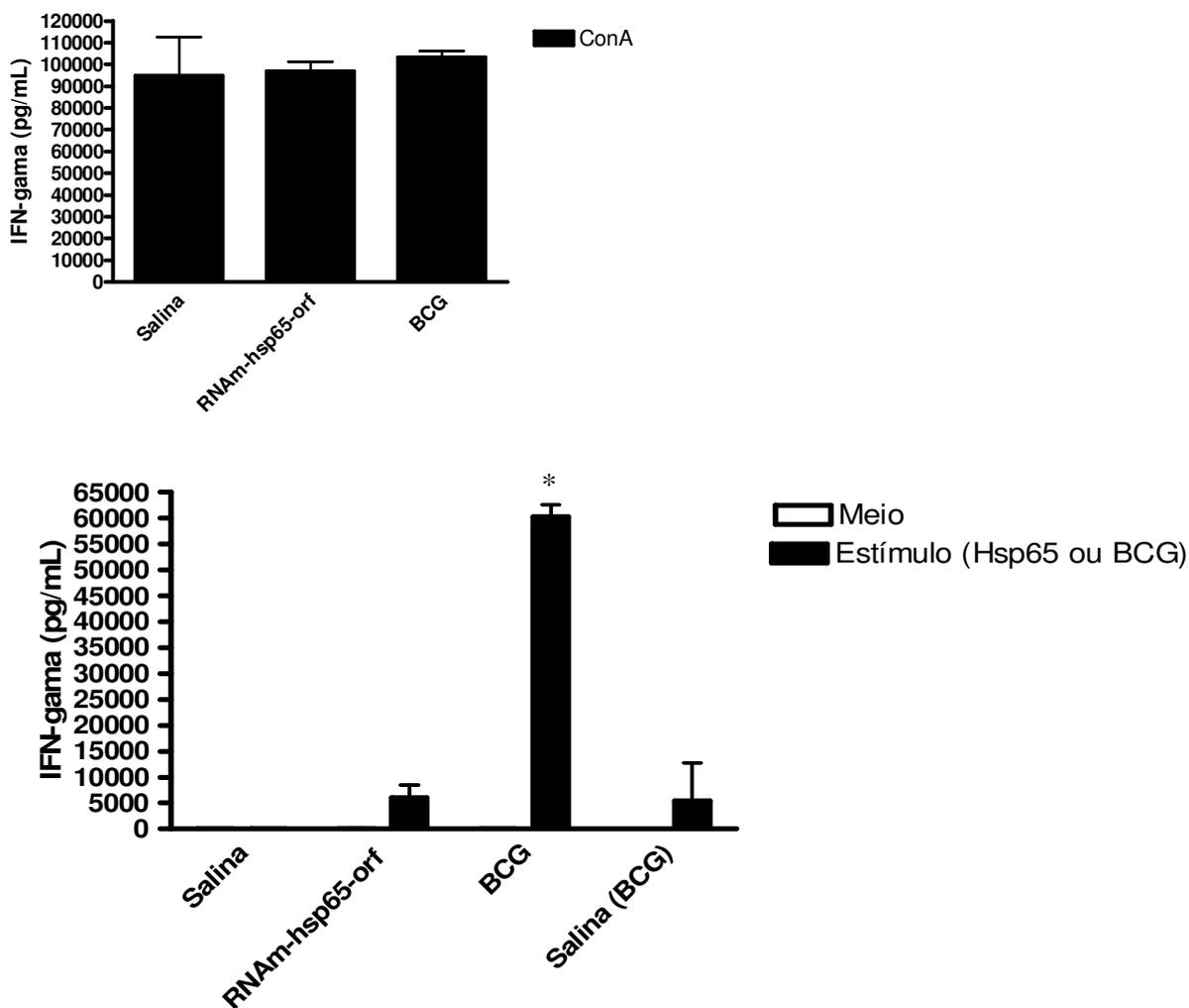


Figura 18. Determinação da produção de IFN- γ por células totais do baço.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intramuscular com 40 μ g de RNAm-hsp65-ORF em 3 doses com intervalos de 15 dias. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu salina. Quinze dias após a última imunização os animais foram sacrificados e seus baços foram extraídos, processado e suas células foram cultivadas em presença de rHSP65 ou Com-A ou BCG por 48 horas. Após esse período o sobrenadante de cultura foi utilizado para a detecção da produção de IFN- γ através do ensaio de ELISA. A diferença estatística foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

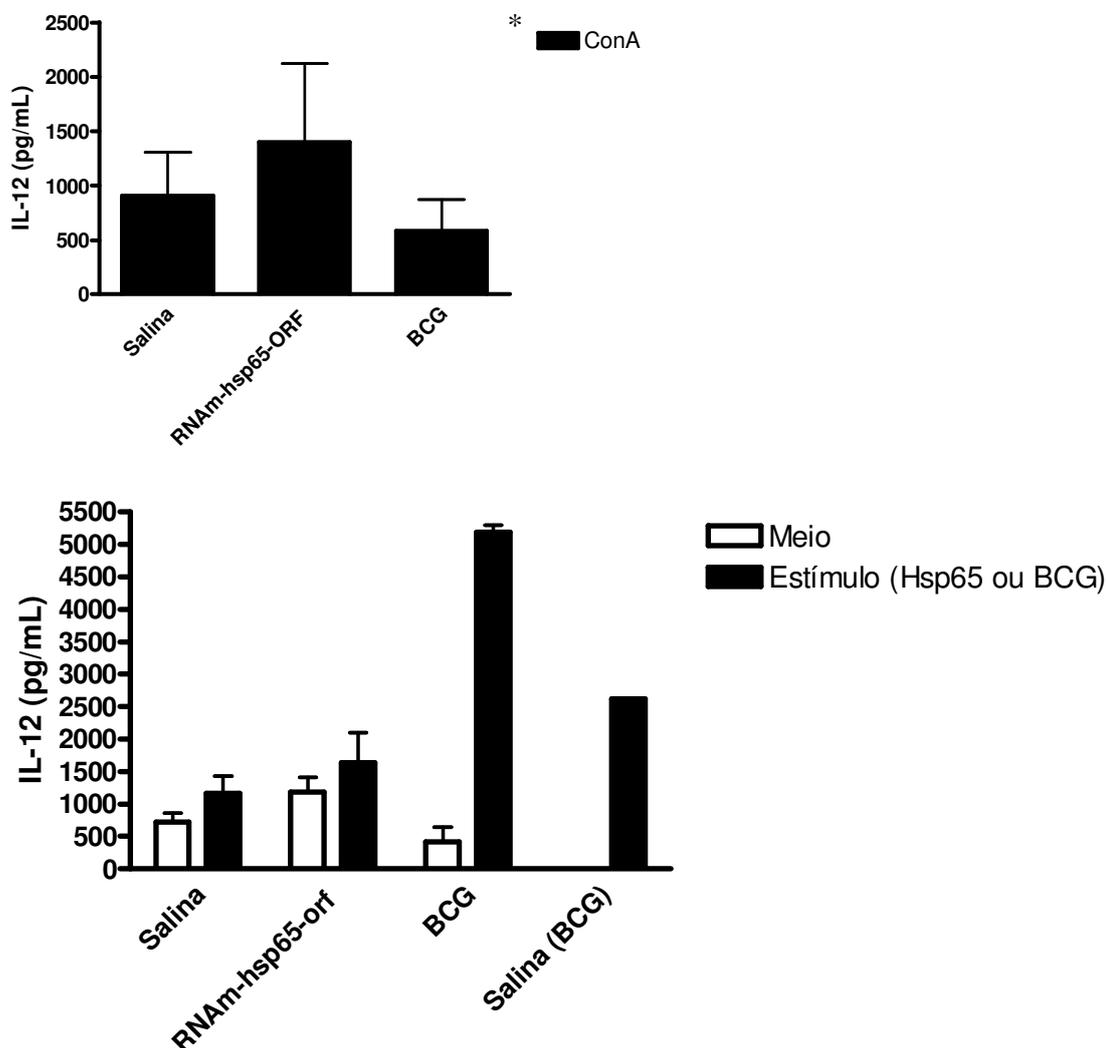


Figura 19. Determinação da produção de IL-12 por células totais do baço.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intramuscular com 40ug de RNAm-hsp65-ORF em 3 doses com intervalos de 15 dias. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu salina. Quinze dias após a última imunização os animais foram sacrificados e seus baços foram extraídos, processado e suas células foram cultivadas em presença de rHSP65 ou Com-A ou BCG por 48 horas. Após esse período o sobrenadante de cultura foi utilizado para a detecção da produção de IL-12 através do ensaio de ELISA. A diferença estatística foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

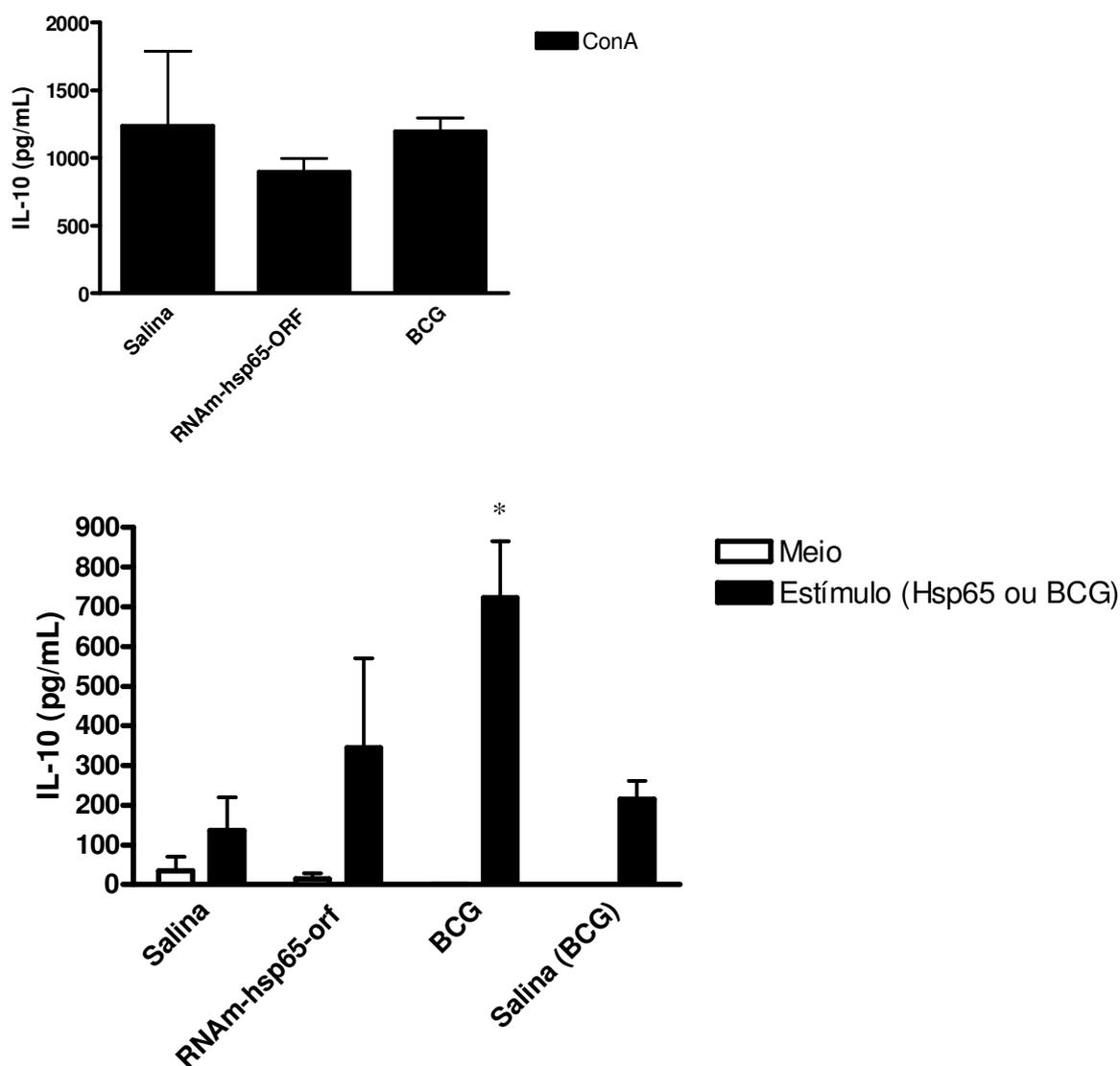


Figura 20. Determinação da produção de IL-10 por células totais do baço.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intramuscular com 40ug de RNAm-hsp65-ORF em 3 doses com intervalos de 15 dias. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu salina. Quinze dias após a última imunização os animais foram sacrificados e seus baços foram extraídos, processado e suas células foram cultivadas em presença de rHSP65 ou Com-A ou BCG por 48 horas . Após esse período o sobrenadante de cultura foi utilizado para a detecção da produção de IL-10 através do ensaio de ELISA. A diferença estatística foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.4 Ensaio de proteção usando três doses de RNAm-hsp65-ORF por rota intramuscular.

A avaliação da capacidade protetora induzida pelo RNAm-hsp65-ORF frente ao desafio com cepa virulenta de *M.tuberculosis* foi determinada pela quantidade de unidades formadoras de colônia recuperadas do pulmão dos animais vacinados. Como pode ser notado na figura 21 somente os animais vacinados com BCG obtiveram uma redução significativa do número de mycobacterias recuperadas de seus pulmões.

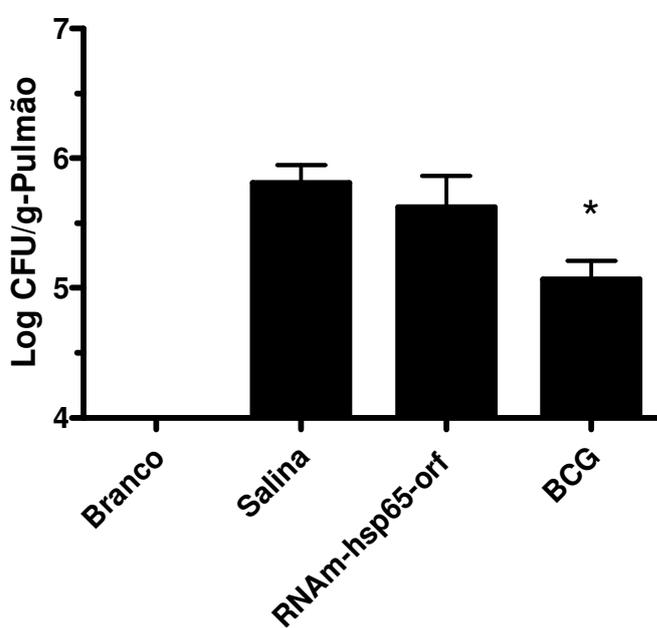


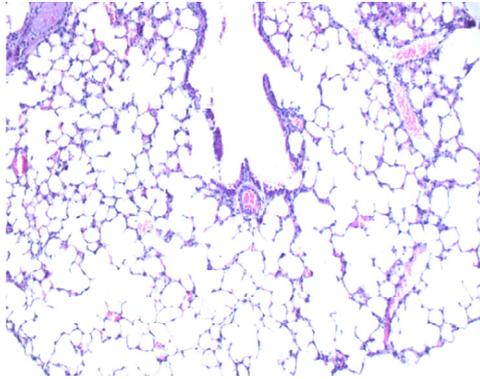
Figura 21. Quantificação das UFC provenientes de pulmão de camundongos vacinados e desafiados com cepa virulenta de *M. tuberculosis*.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intramuscular com 40ug dos diferentes RNAs testados em 3 doses com intervalos de 15 dias. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu salina. Trinta dias após a última imunização os animais foram desafiados com 10^5 bacilos da cepa virulenta H37RV de *M.tuberculosis* pela via intranasal. O grupo não infectado (Branco) não foi desafiado. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônias. A diferença estatística foi considerada como significante quando $*p<0,05$ em relação ao grupo salina.

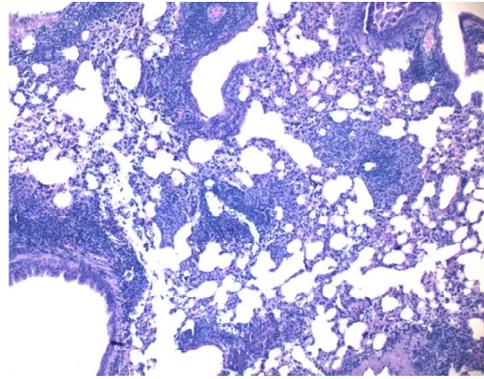
4.5 Análise histopatológica do pulmão dos camundongos vacinados com três doses de RNAm-hsp65-ORF por via intramuscular.

A análise histopatológica é essencial para avaliar a eficácia de novas vacinas, uma vez que além da redução nas UFCs, uma boa estratégia também deve preservar o parênquima pulmonar.

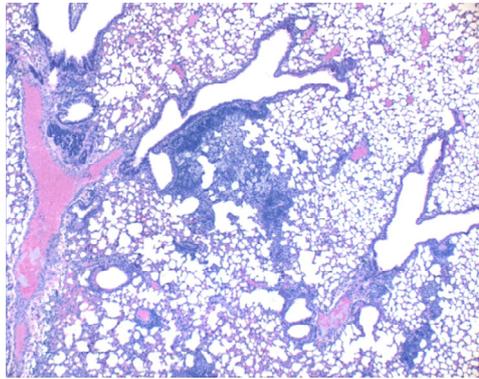
Dessa forma os pulmões dos animais imunizados e infectados com RNAm-hsp65-orf foram coletados e analisados trinta dias após o desafio. O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal. O grupo de animais infectados que só recebeu salina apresenta uma pneumonia tuberculosa com grande comprometimento do parênquima pulmonar apresentando um intenso infiltrado inflamatório difuso com presença de células mononucleares de localização intra-alveolar, edema e exudato fibrinoso, além de uma intensa inflamação peribronquiolar e perivascular. O grupo de animais vacinados com mostram a presença de infiltrados inflamatórios locais e também inflamação peribronquiolar e perivascular. Em conjunto com os dados da UFC podemos sugerir que a vacinação pela rota intramuscular não foi eficiente em controlar a infecção, a qual gerou dano tecidual no parênquima pulmonar.



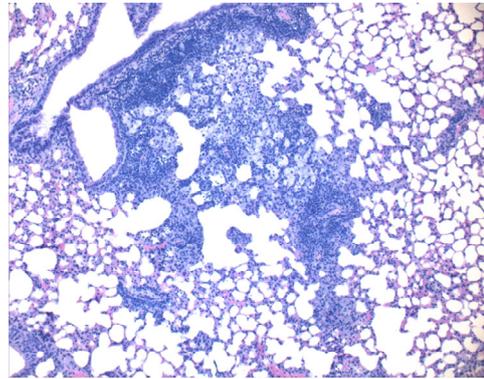
Branco 100X



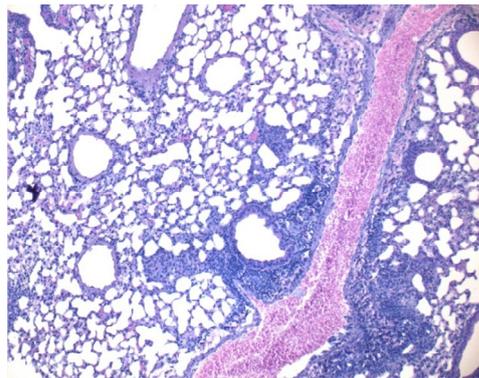
Salina 100X



RNAm-hsp65-orf 120ug 50X



RNAm-hsp65-orf 120ug 100X



BCG 100X

Figura 22. Análise histológica do pulmão de camundongos Balb/c imunizados com três doses de RNAm-hsp65-orf por via intramuscular e posteriormente desafiados com *M. tuberculosis*. Coloração com hematoxilina e eosina (HE), aumento original 100X.

4.6 Avaliação da resposta imune humoral e celular das vacinas administradas por via intranasal.

Para a realização dos experimentos apresentados a seguir, os animais foram imunizados por via intranasal com uma dose de 5 μ g (grupo R5) ou 10 μ g (grupo R10) de RNAm-hsp65-ORF na forma nu. Foram também imunizados animais com formulações contendo RNAm-hsp65-ORF encapsulado no lipídeo catiônico DOTAP também nas concentrações de 5 μ g (grupo R5/D) ou 10 μ g (grupo R10/D). Ambas as formulações foram administradas no veículo de injeção “Solução de Ringer-Lactato”. Após 13 ou 28 dias decorridos da imunização os camundongos foram re-estimulados com uma nova dose de 5 μ g de RNAm-hsp65-ORF, novamente por via intranasal. Quinze dias depois da primeira imunização foram avaliados os seguintes parâmetros imunológicos: Produção de anticorpos específicos, e produção de citocinas. Alternativamente 30 dias após a primeira imunização os camundongos foram sacrificados para a avaliação dos seguintes parâmetros imunológicos: a produção de anticorpos específicos à HSP65, a quantificação do número de células de memória de perfil CD4 ou CD8 CD44^{hi}/CD62L^{Low}, bem como a detecção dos seguintes fatores de transcrição gênica: GATA3 e TBet em tecidos provenientes do pulmão desses camundongos.

4.6.1 Produção de anticorpos específicos à HSP65

Como pode ser analisado pelas figuras 23, 24, 25 e 26 a imunização com as diferentes formulações contendo o RNAm-hsp65-ORF não induziram uma produção significativa dos isotipos de anticorpos indicados tanto 15 quanto 30 dias após a imunização. Na figura 23 observa-se que nenhuma formulação induziu níveis significativos de IgG1 aos 15 ou 30 dias após as imunizações. A formulação R10/Dotap mostrou tendência de aumento aos 15 dias mas que não se manteve aos 30 dias. Da mesma forma a produção de IgG2A não se mostrou significativa nos dois tempos avaliados da imunização intranasal. A fim de verificar se outro isotipo estava sendo produzido após a vacinação intranasal dosamos os níveis de IgA e IgM. A figura 25 mostra que não houve aumento nos títulos de IgA anti-hsp64 nos tempos avaliados. Também não houve aumento de IgM anti-hsp65 mesmo após 30 dias da vacinação mesmo com o booster que foi dado por via intranasal 48 horas antes do sacrifício e da subsequente dosagem dos anticorpos. Em conjunto esses resultados sugerem que independentemente da rota de imunização, o RNAm-hsp65-ORF não induz níveis detectáveis de anticorpos anti-hsp65.

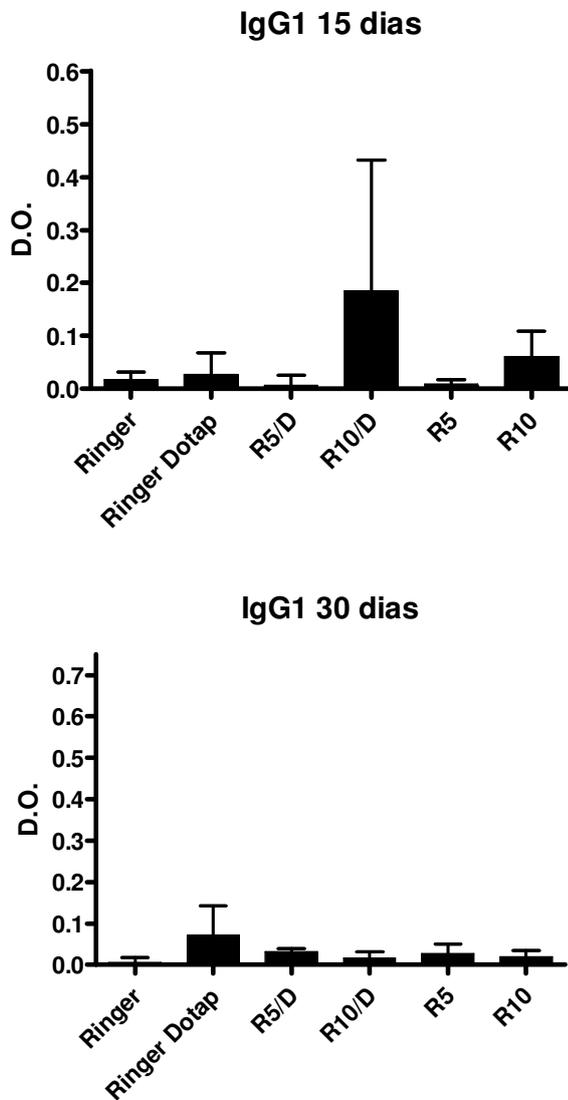


Figura 23. Determinação da produção de anticorpos IgG1 anti-hsp65.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNAm-hsp65-ORF. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. O soro foi coletado no primeiro dia do experimento (Pré-Imune) e após 15 e 30 dias da última imunização. Os níveis de anticorpos anti-hsp65 foram determinados por ELISA e os resultados são representados pelo valor da Densidade Óptica subtraído da média dos valores pré-imune.

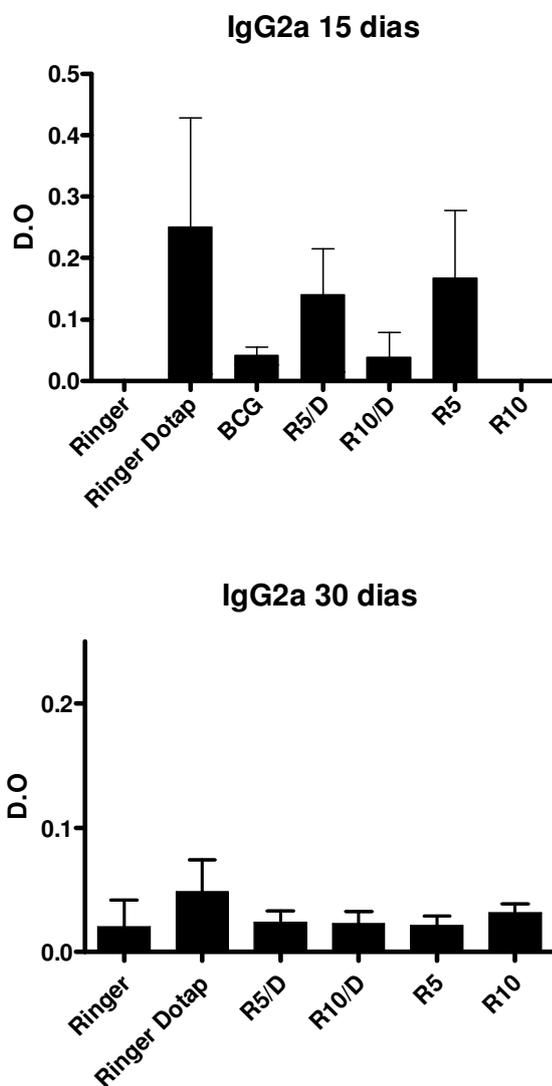


Figura 24. Determinação da produção de anticorpos IgG2A anti-hsp65.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNAm-hsp65-ORF. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. O soro foi coletado no primeiro dia do experimento (Pré-Imune) e após 15 e 30 dias da última imunização. Os níveis de anticorpos anti-hsp65 foram determinados por ELISA e os resultados são representados pelo valor da Densidade Óptica subtraído da média dos valores pré-imune.

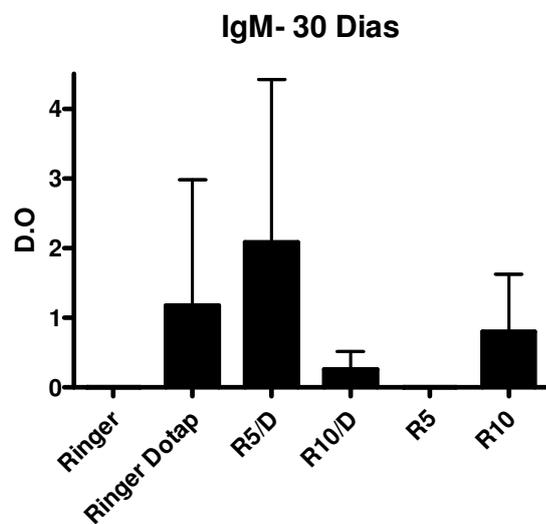


Figura 25. Determinação da produção de anticorpos IgM anti-hsp65.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. O soro foi coletado no primeiro dia do experimento (Pré-Imune) e após 15 e 30 dias da última imunização. Os níveis de anticorpos anti-hsp65 foram determinados por ELISA e os resultados são representados pelo valor da Densidade Ótica subtraído da média dos valores pré-imune.

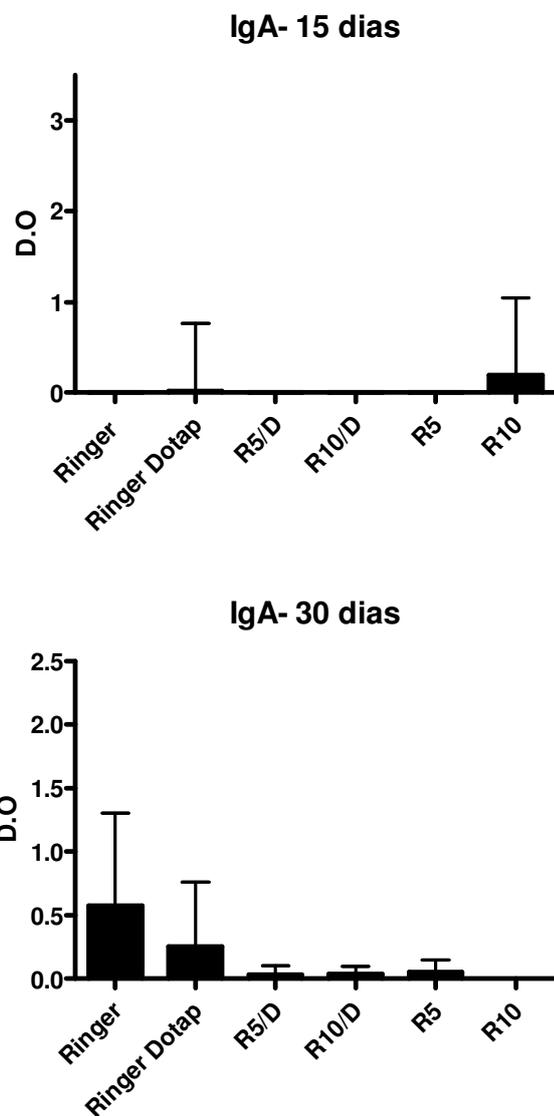


Figura 26. Determinação da produção de anticorpos IgA anti-hsp65.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. O soro foi coletado no primeiro dia do experimento (Pré-Imune) e após 15 e 30 dias da ultima imunização. Os níveis de anticorpos anti-hsp65 foram determinados por ELISA e os resultados são representados pelo valor da Densidade Ótica subtraído da média dos valores pré-imune.

4.6.2 Avaliação da produção de citocinas por células isoladas do baço ou de linfonodos drenantes pulmonares de animais após 15 dias a vacinação intranasal com RNAmhsp65-ORF.

Para avaliar se a vacinação com RNAm-hsp65-ORF pela via intranasal era capaz de induzir a produção de citocinas, nós avaliamos o a capacidade de células provenientes do baço e de um pool de células isoladas dos linfonodos cervicais profundos e superficiais, axilar e o traqueal.

Como pode ser observado pela análise das figuras 27 a 30, nenhuma formulação induziu a produção de TNF-alfa, IL12, IL10 e IL5 tanto por células provenientes do baço quando por células provenientes dos linfonodos avaliados quando comparado ao estímulo policlonal com Con-A.

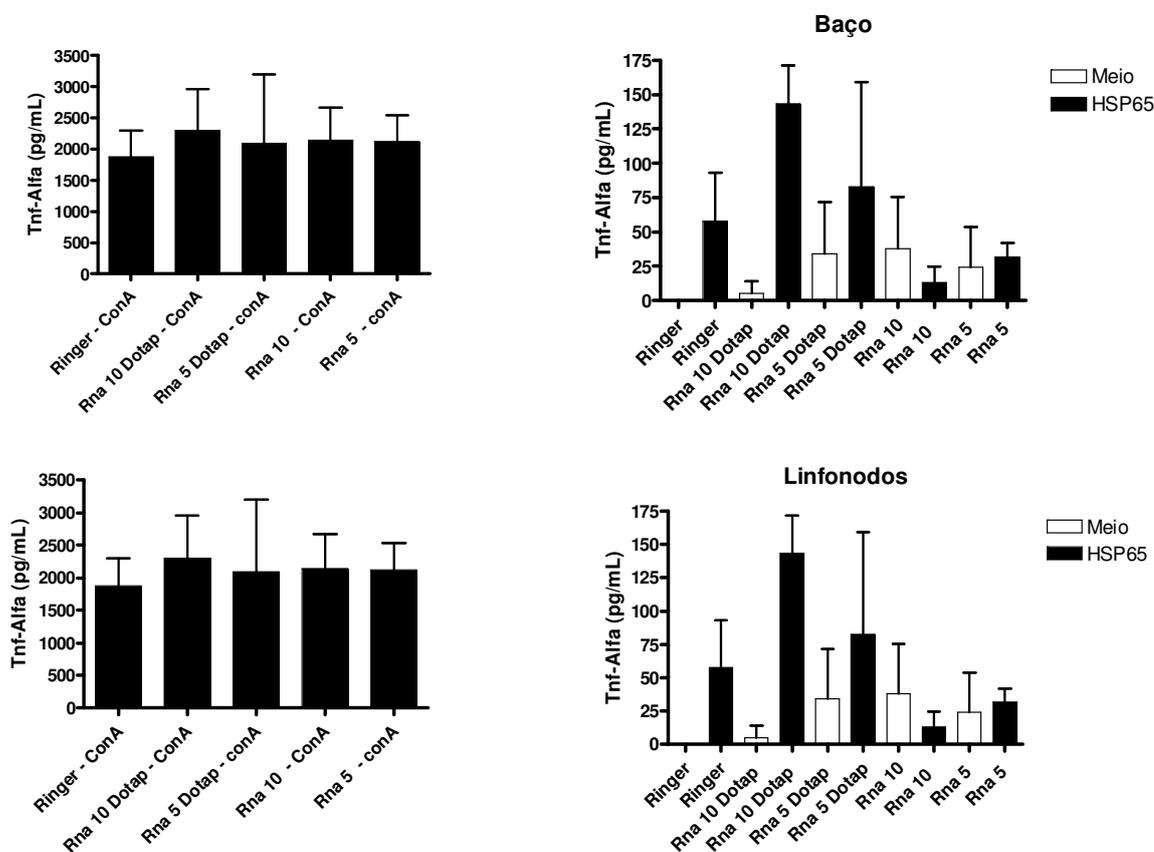


Figura 27. Determinação da produção de TNF- α por células totais do baço ou de linfonodos drenantes do pulmão de animais imunizados.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNAmhsp65-ORF. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e seus baços e linfonodos drenantes do pulmão foram extraídos para a avaliação da produção de Tnf-alfa, através do ensaio de ELISA, usando estimulados com rHSP65 ou Con-A. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo Ringer.

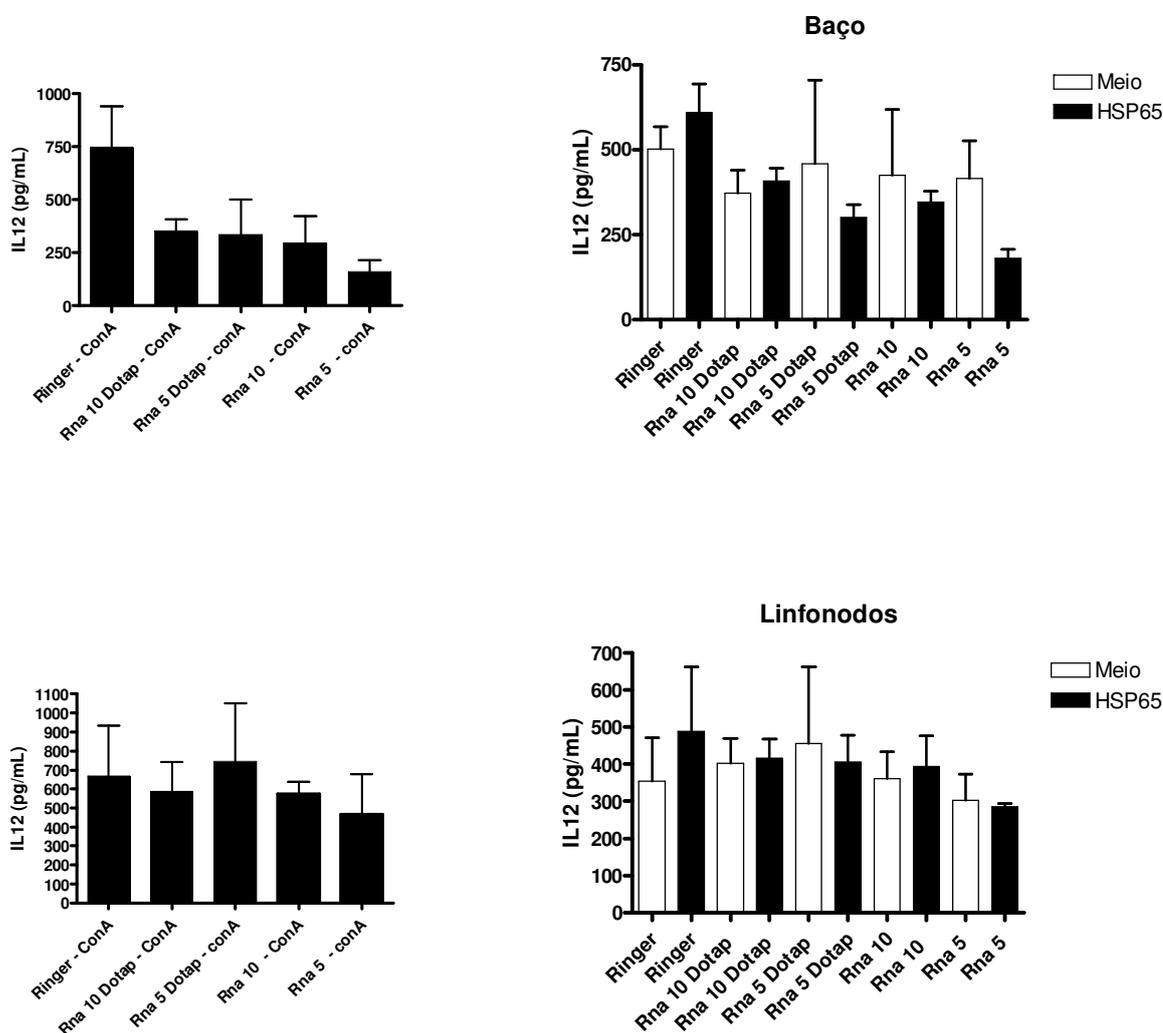


Figura 28. Determinação da produção de IL12 por células totais do baço ou de linfonodos drenantes do pulmão de animais imunizados.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo. RNAmhsp65-ORF. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e seus baços e linfonodos drenantes do pulmão foram extraídos para a avaliação da produção de IL12, através do ensaio de ELISA, quando estimulados com rHSP65 e Con-A. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo Ringer.

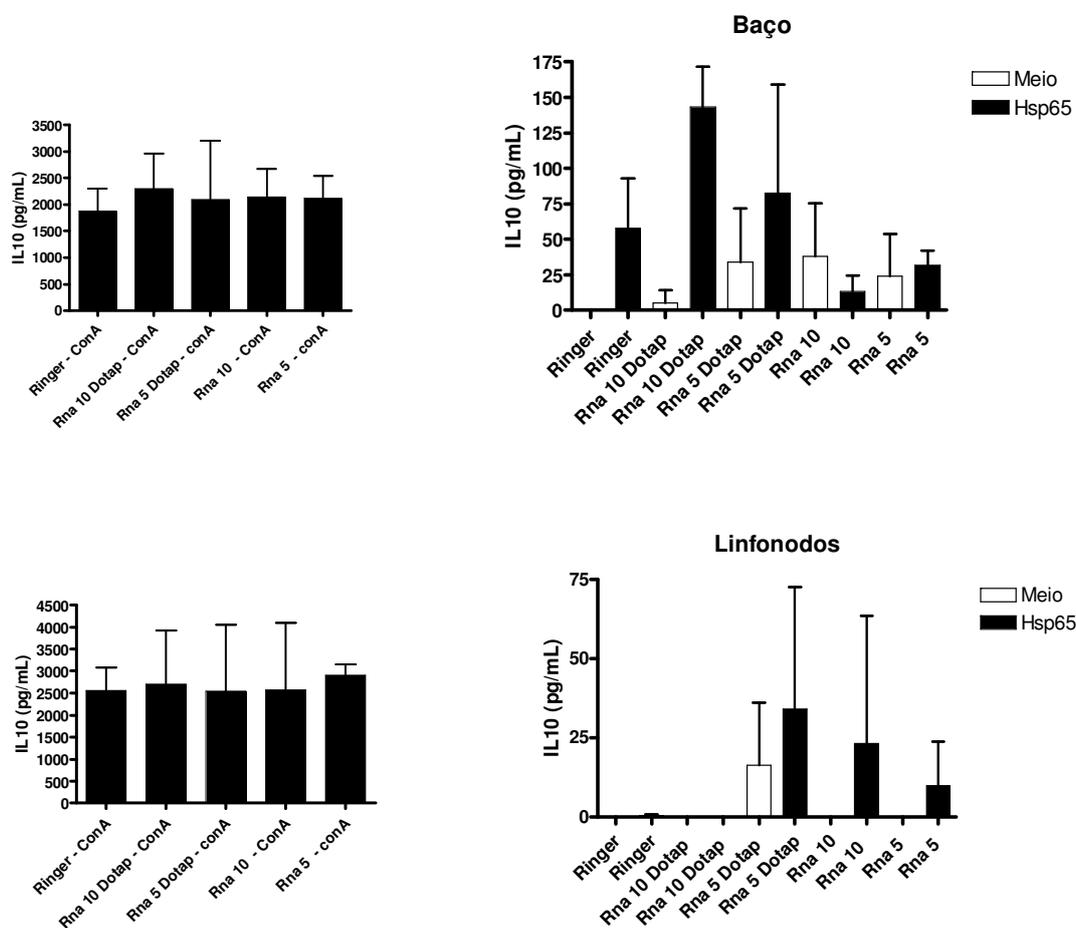


Figura 29. Determinação da produção de IL10 por células totais do baço ou de linfonodos drenantes do pulmão de animais imunizados.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNAmhsp65-ORF. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e seus baços e linfonodos drenantes do pulmão foram extraídos para a avaliação da produção de IL10, através do ensaio de ELISA, quando estimulados com rHSP65 e Con-A. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo Ringer.

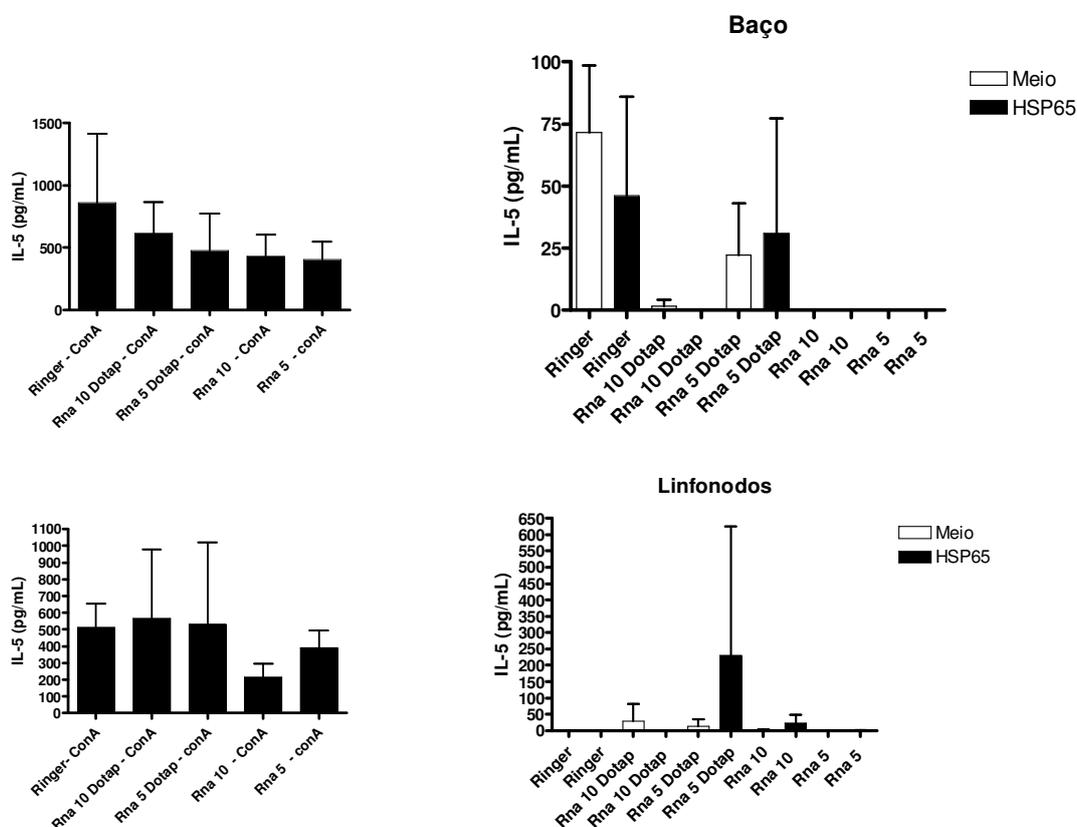


Figura 30. Determinação da produção de IL5 por células totais do baço ou de linfonodos drenantes do pulmão de animais imunizados.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNAmhsp65-ORF. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e seus baços e linfonodos drenantes do pulmão foram extraídos para a avaliação da produção de IL5, através do ensaio de ELISA, quando estimulados com rHSP65 e Con-A. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo Ringer.

4.6.3 Avaliação quantitativa das subpopulações de células T com fenótipo: CD4 ou CD8 ou, CD4/CD44^{hi}/CD62^{Low} e CD8/CD44^{hi}/CD62^{Low} presentes no pulmão dos animais imunizados com RNA-mhsp65-ORF.

Uma vez que os níveis de citocinas e de anticorpos não mudaram após a vacinação pela rota intranasal, nosso próximo passo foi avaliar a população de linfócitos T, presentes no pulmão dos animais 30 dias após a vacinação. A figura 31 mostra o perfil de células T CD4 ou CD8. Pode-se observar que em relação aos animais não imunizados com RNA-mhsp65-ORF (grupo Ringer) houve um aumento na população de células T CD4 em todos os grupos analisados. Esse aumento da população de linfócitos foi menos evidente na subpopulação de células CD8. Curiosamente, após a vacinação com BCG não se verificou um aumento significativo na população de células T CD4.

Outra característica da resposta imune analisada foi a geração de células de memória após 30 dias da imunização. Para esse experimento após 28 dias da primeira imunização, todos os camundongos imunizados com RNA-mhsp65-ORF receberam uma nova dose de 10ug novamente por via intranasal. Dois dias após esse “booster” foi analisada a porcentagem das subpopulações CD4 e CD8 com perfil de memória presentes nos pulmões desses animais.

Nessa análise foram observados perfis diferentes entre os grupos e entre as subpopulações de memória CD4 e CD8. A figura 32 mostra que a subpopulação CD4/CD44^{hi}/CD62^{Low} mostrou-se aumentada significativamente somente nos animais vacinados com 10ug de encapsulado com DOTAP. Com relação a vacinação com BCG essa população não mostrou diferença significativa em relação ao grupo imunizado com a solução de Ringer. Esses dados sugerem que apenas a vacinação com RNA-mhsp65-ORF encapsulado com DOTAP induziu uma subpopulação de memória com fenótipo CD4/CD44^{hi}/CD62^{Low}. Já a subpopulação CD8/CD44^{hi}/CD62^{Low} mostrou redução nos grupos que receberam 5ug de RNA-mhsp65-ORF encapsulado em DOTAP e no grupo que recebeu 10ug RNA-mhsp65-ORF nu quando comparado aos grupos controle, mas não teve alteração significativa nos demais grupos.

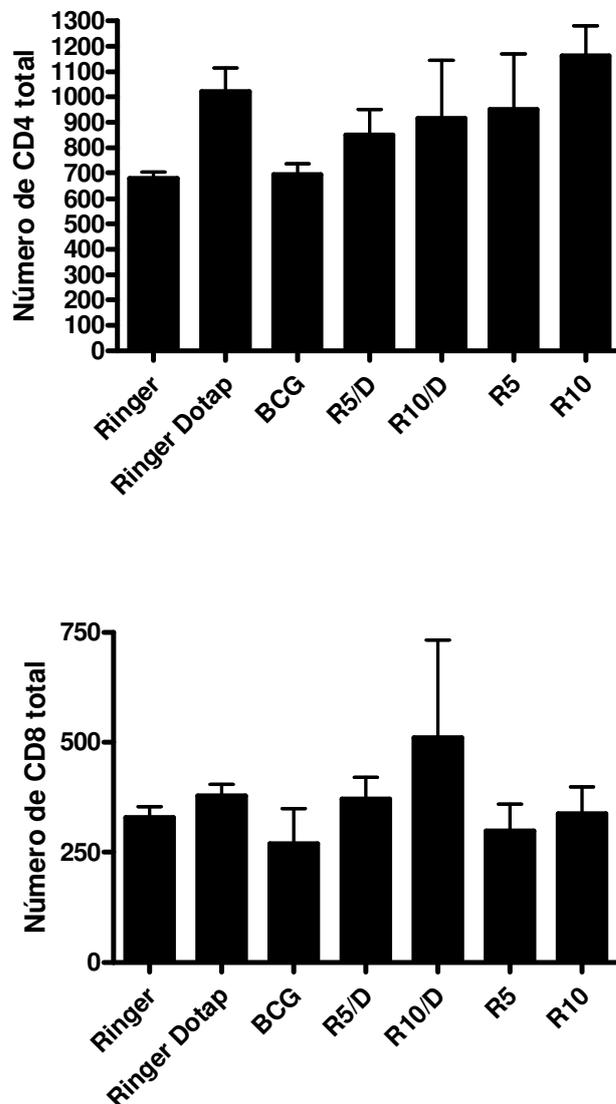
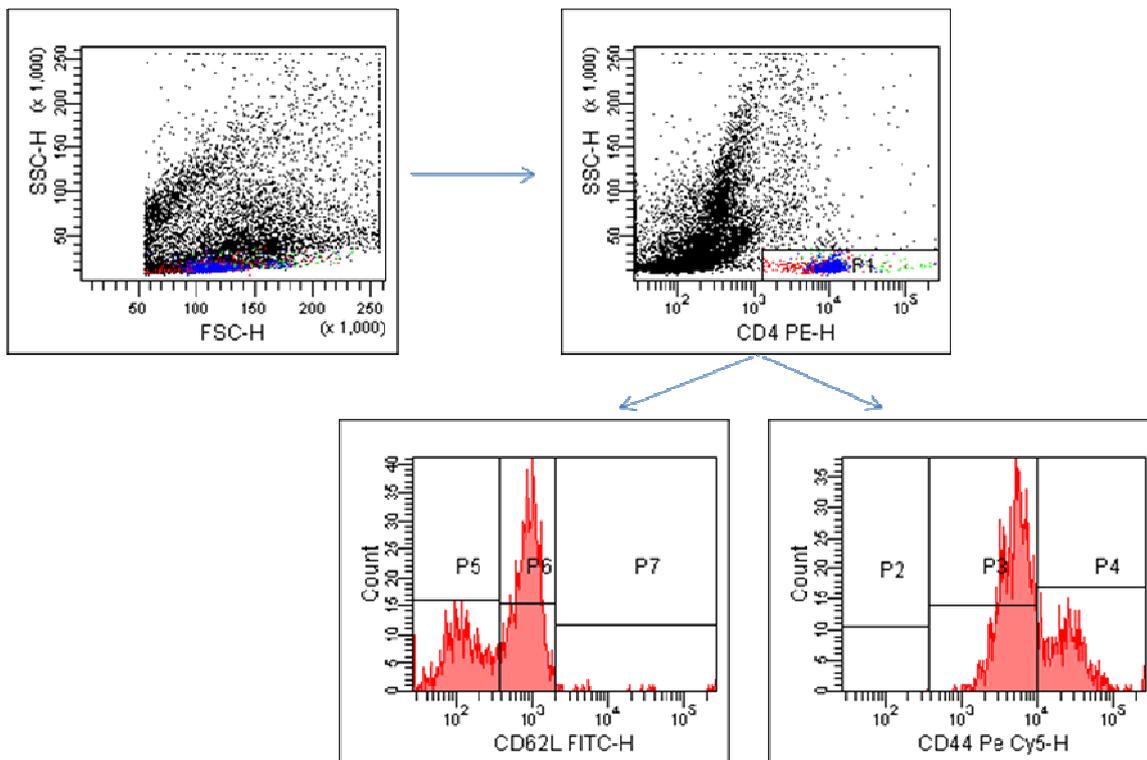


Figura 31. Perfil de células T povoamento do pulmão de animais imunizados após 30 dias.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNA-mhsp65-ORF. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. Trinta dias após a imunização os camundongos foram sacrificados e a densidade pulmonar de células T das subpopulações CD4 e CD8 foram analisadas por citometria de fluxo.



Esquema 1. Parâmetros obtidos pelo FACS para análise das subpopulações CD4, CD8 e células T de memória.

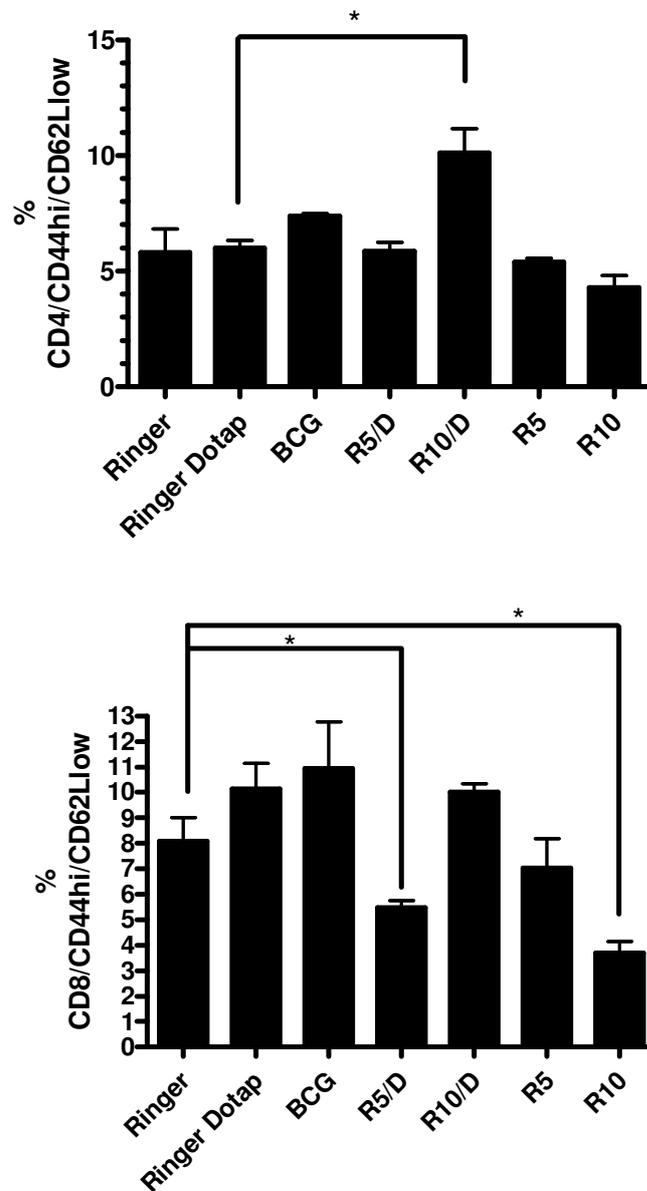


Figura 32. Avaliação da quantidade de células T de memória presentes no pulmão de animais imunizados após 30 dias.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNA-mhsp65-ORF. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu salina. Trinta dias após a imunização os camundongos foram sacrificados e a densidade pulmonar de células T das subpopulações CD4 e CD8 com fenótipos CD44^{hi} e CD62^{Low} foram analisadas por citometria de fluxo.* quando P<0,05.

4.6.5 Avaliação da expressão gênica de fatores de transcrição importantes na resposta imune

Desde que não conseguimos detectar alteração na produção de citocinas nos protocolos anteriores, optamos por uma técnica mais sensível, o Real-Time PCR e analisamos os fatores de transcrição GATA-3 e T-BET. Pode-se visualizar na figura 33 que em valores absolutos os grupos que receberam a solução de Ringer, Ringer/Dotap e BCG tiveram a produção de GATA-3 em grande quantidade. Já os outros grupos tiveram uma menor indução desse gene. Quanto ao fator de transcrição T-Bet todos os grupos Ringer e Ringer/Dotap tiveram uma produção mais alta deste gene em relação aos outros grupos que tiveram uma produção basal do mesmo. Assim, esses dados mostram que a vacinação com RNA-mhsp65-ORF encapsulado ou não parece levar a diminuição da expressão de GATA-3 quando comparados aos respectivos controles e BCG, sugerindo uma modulação da resposta imune redução do padrão Th2.

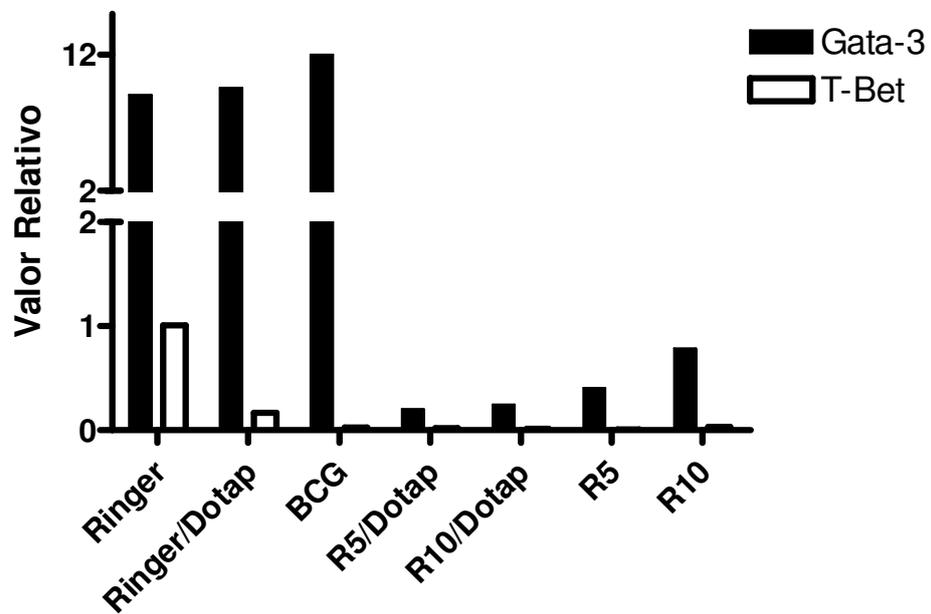


Figura 33. Avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição GATA-3 e T-BET presentes no pulmão de animais imunizados após 30 dias.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNA-mhsp65-ORF. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu Ringer. Trinta dias após a imunização os camundongos foram sacrificados e o lóbulo inferior esquerdo de seus pulmões foi extraído. O RNA total desse tecido foi extraído e partir dele foi realizado o processamento para a reação de PCR em tempo real para a avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição GATA-3 e T-BET.

4.7 Protocolo vacinal usando uma dose de RNA-mhsp65-ORF nu ou encapsulado pela rota intranasal.

A avaliação da capacidade protetora induzida pelo, frente ao desafio com cepa virulenta de *M.tuberculosis* foi determinada pela quantidade de unidades formadoras de colônia recuperadas do pulmão dos animais vacinados. Como pode ser notado na figura 34 somente os animais vacinados com RNA nu na concentração de 10 ug e o grupo que recebeu BCG obtiveram uma redução significativa do número de mycobacterias recuperadas de seus pulmões, sugerindo que a vacinação com RNA-mhsp65-ORF nu foi eficiente em induzir resposta imune protetora.

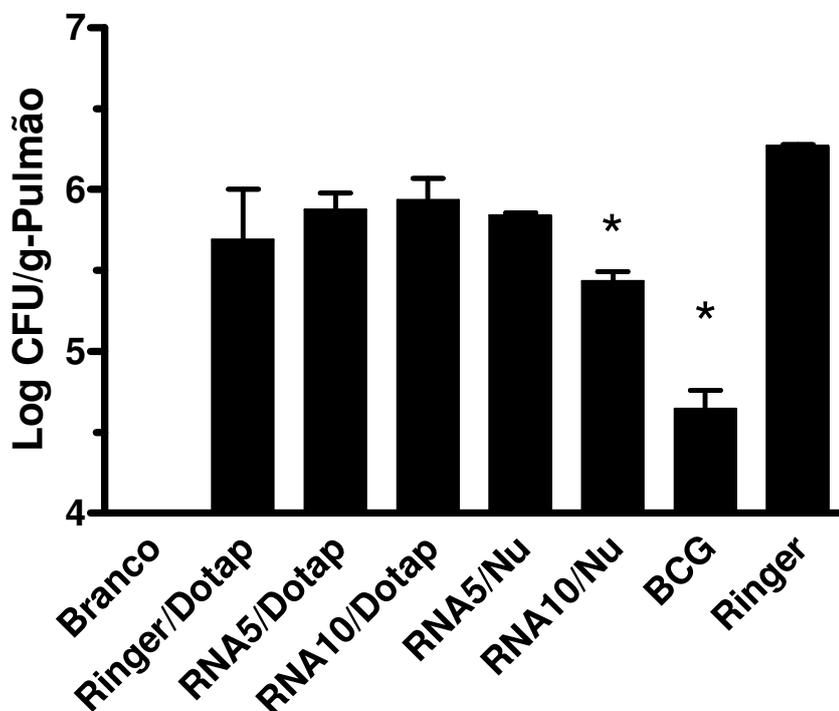


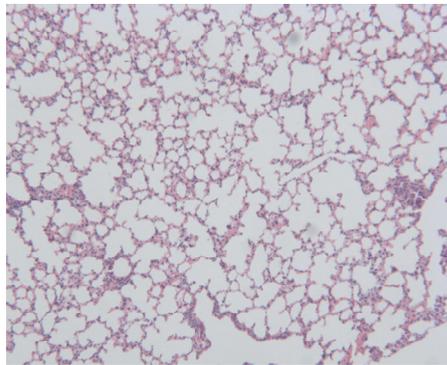
Figura 34. Quantificação das UFC provenientes de pulmão de camundongos vacinados e desafiados com cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose das diferentes formulações contendo RNA-mhsp65-ORF. O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG *Moreau* por via subcutânea. O grupo controle recebeu a solução de Ringer. Trinta dias após a última imunização os animais foram desafiados com 10^5 bacilos da cepa virulenta H37RV de *M.tuberculosis* pela via intranasal. O grupo Branco não foi desafiado. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônias. A diferença estatística foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo Ringer.

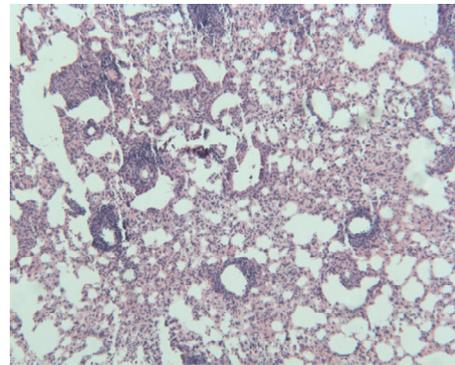
4.7.1 Análise histopatológica do pulmão dos camundongos vacinados com uma dose de por via intranasal.

Para verificar a integridade tecidual dos pulmões, após a vacinação com RNA-mhsp65-ORF por rota intranasal ou com BCG foram realizados cortes histológicos do tecido pulmonar 30 dias após o desafio com *M.tuberculosis*. A figura 35 mostra que quando comparados com os animais apenas infectados (grupo Ringer), a vacinação com 5 ou 10 ug de RNA-mhsp65-ORF nu manteve a integridade do tecido. Isso fica mais evidente com o tratamento com 10ug de RNA-mhsp65-ORF nu. A vacinação usando o RNA-mhsp65-ORF encapsulado não reduziu o influxo inflamatório, levando ou dano tecidual semelhante ao animal só infectado.

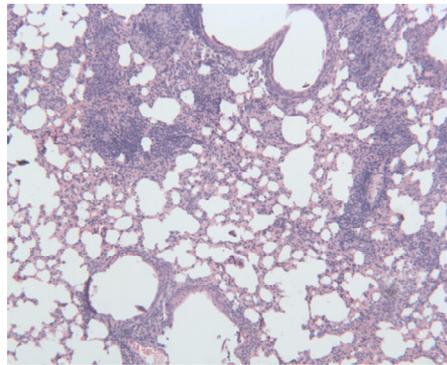
Os animais vacinados com BCG também mostraram melhor integridade do tecido pulmonar semelhante ao RNA-mhsp65-ORF nu. Esses dados sugerem que a vacinação com RNA-mhsp65-ORF nu além de induzir a redução do número micobacterias pulmonares também manteve preservado o tecido pulmonar.



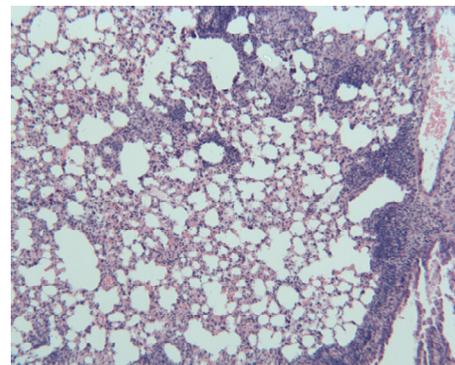
Normal 100X



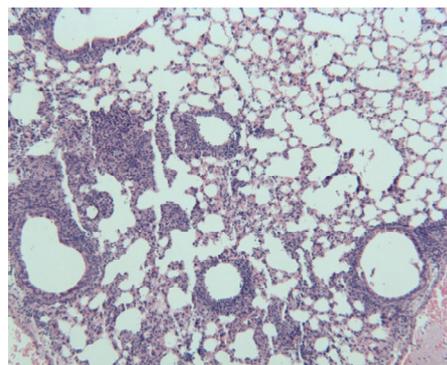
Ringer 100X



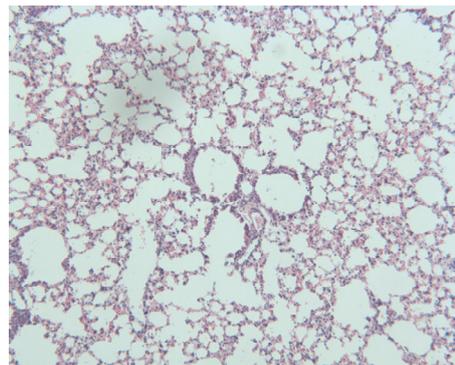
Ringer- DOTAP



RNAm-hsp65-orf -5ug/Dotap – Grupo R5/D

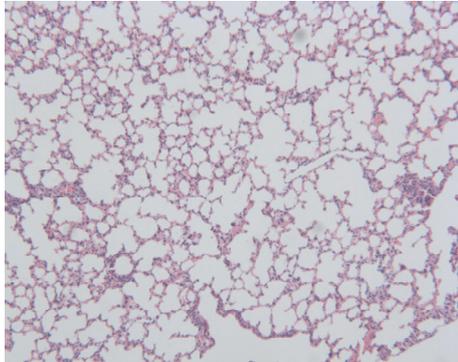


RNAm-hsp65-orf -10ug/Dotap – Grupo R10/D

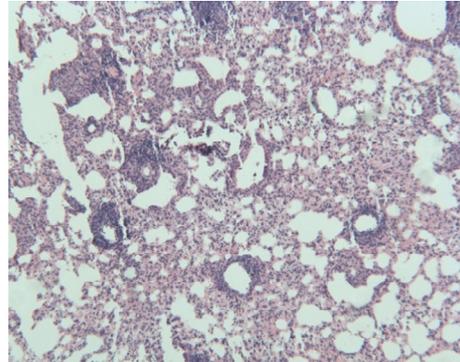


RNAm-hsp65-orf -5ug – Grupo R5

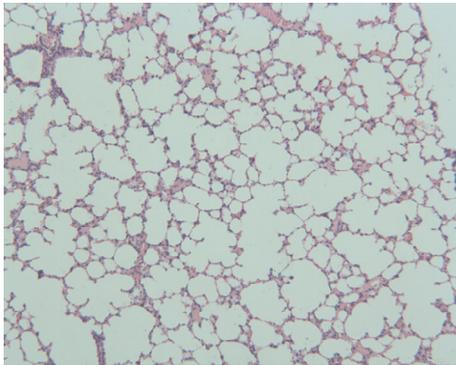
Figura 35. Análise histológica do pulmão de camundongos Balb/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Coloração com hematoxilina e eosina (HE), aumento original 100X



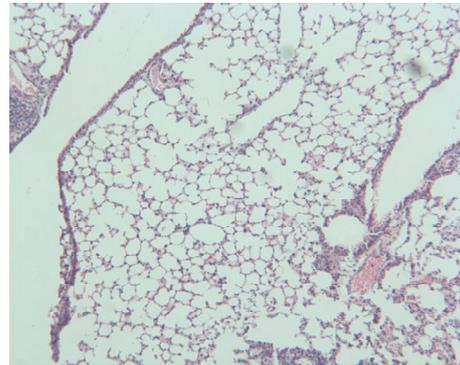
Normal 100X



Salina 100X



RNAm-hsp65-orf 10ug – Grupo R10



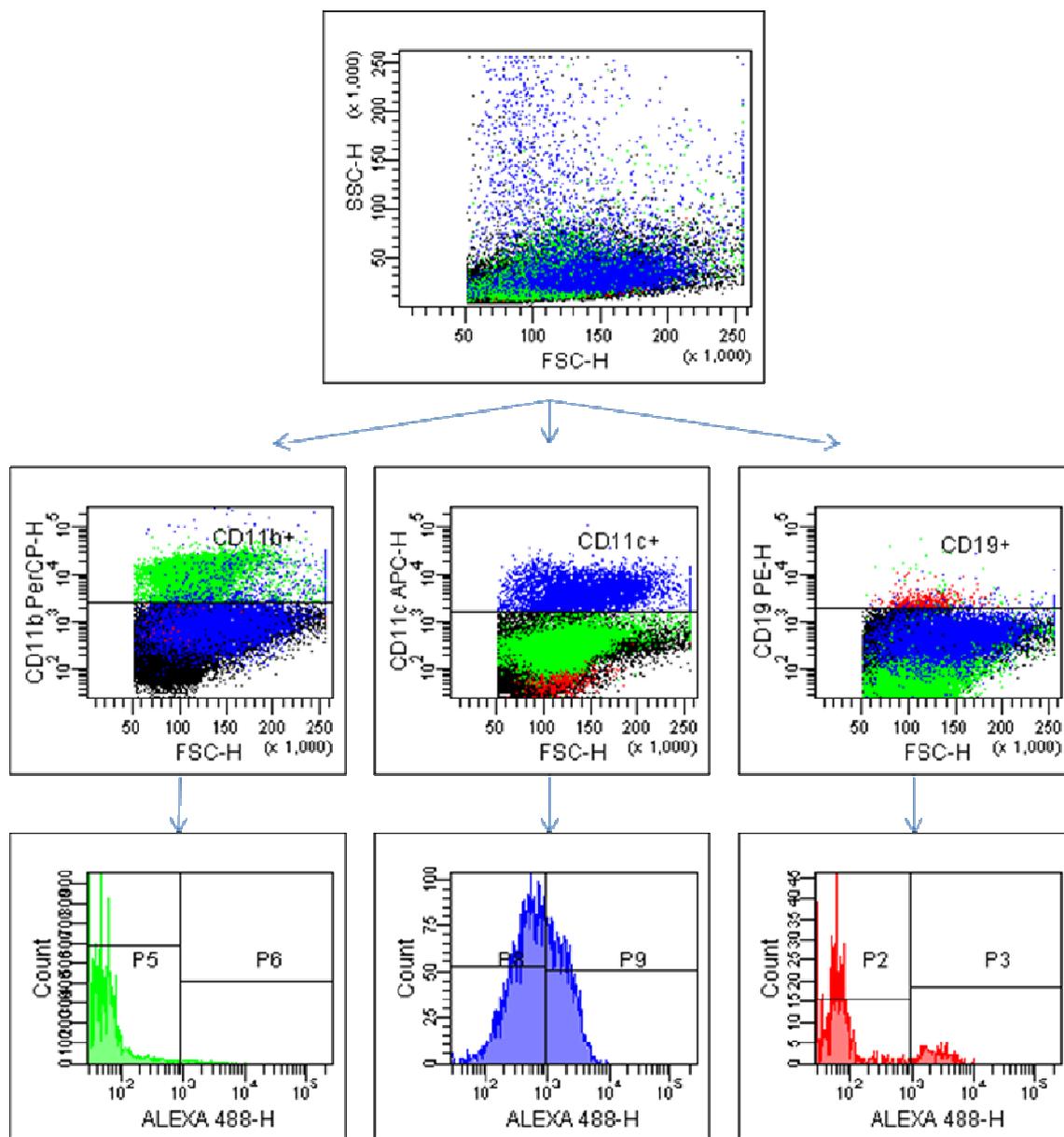
BCG

Figura 35. Análise histológica do pulmão de camundongos Balb/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Coloração com hematoxilina e eosina (HE), aumento original 100X

4.8 Avaliação da captura do por células pulmonares

4.8.1 Cinética da quantificação da capacidade das células apresentadoras de antígeno profissionais em capturar do RNAm.

Para verificar os tipos celulares envolvidos na captura do RNA-mhsp65-ORF *in vivo*, após a vacinação intranasal com RNA-mhsp65-ORF marcado com fluorocromo Alexa 488 realizamos uma cinética da captura do mesmo e avaliamos os tipos celulares envolvidos nesse processo por citometria de fluxo. O esquema 2 demonstra a metodologia utilizada para a análise da captura do RNA-mhsp65-ORF marcado pelas células pulmonares. A figura 36-A mostra a contagem total de cada população presente no pulmão nos diferentes tempos analisados após a inoculação do RNAm, independentemente de terem capturado o RNA-mhsp65-ORF ou não. Dentro de cada população analisada, o número de cada subpopulação que capturou o RNA-mhsp65-ORF está indicado em números totais na figura 36-B, ou em porcentagem na figura 37. Em conjunto, esses dados mostram que a captura por linfócitos B se mantêm em torno de 20% durante os tempos analisados, enquanto as células dendríticas têm um pico de captura em 4 horas seguido de uma queda as oito horas. Porém, levando-se em consideração o número de células, as células dendríticas parecem capturar maior número de RNAmhsp65-ORF. Os macrófagos, por sua vez, também mantêm nível basal de captura durante o período analisado. Assim, os dados sugerem que após a vacinação, as principais APCs presentes no pulmão envolvidas com o processamento antigênico são capazes de capturar o RNA-mhsp65-ORF administrado.



Esquema 2. Parâmetros obtidos pelo FACS para análise das subpopulações: CD11c, CD11b e CD19.

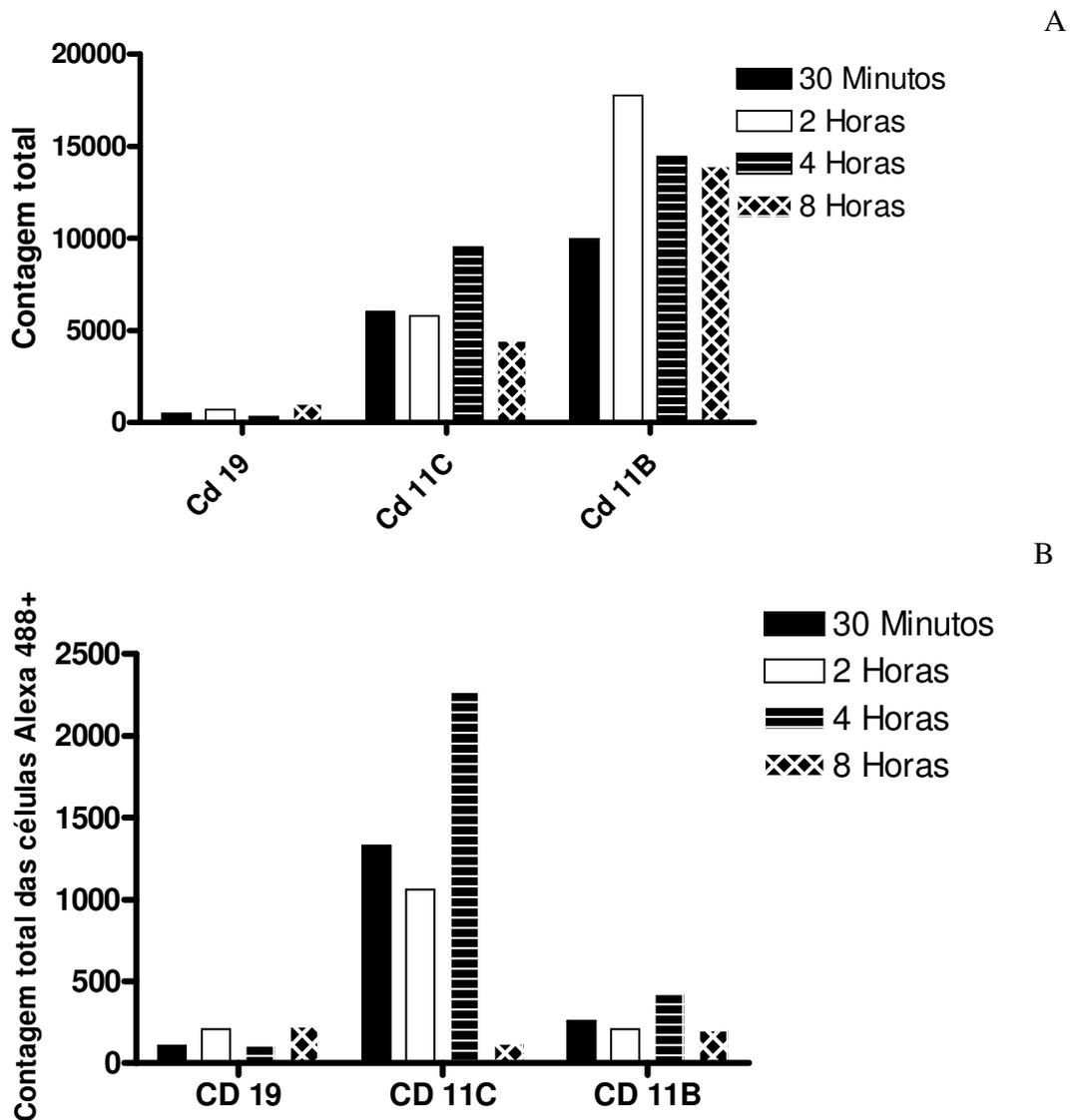


Figura 36. Avaliação da quantidade de células apresentadoras de antígeno profissionais capazes de capturar RNA-mhsp65-ORF marcado com Alexa488.

Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose de 10ug de marcado com Alexa488. O grupo controle recebeu solução de Ringer. A cinética da captura foi realizada nos diferentes tempos (indicados na legenda) e o fenótipo celular detectado por citometria de fluxo. A figura A mostra o numero total de células presentes no pulmão nos diferentes períodos analisado, enquanto a figura B indica a contagem total das células que capturaram RNA marcado com alexa 488.

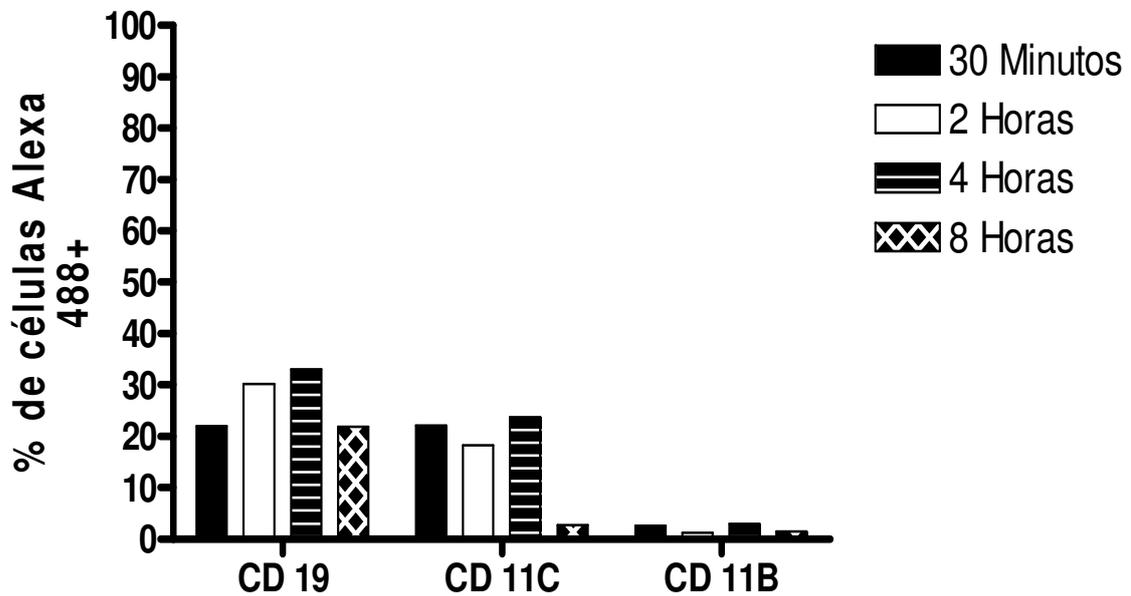


Figura 37. Determinação da porcentagem de células apresentadoras de antígeno profissionais no pulmão dos camundongos após a imunização com RNA-mhsp65-ORF marcado com Alexa488. Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose de 10ug de RNA-mhsp65-ORF marcado com Alexa488. O grupo controle recebeu solução de Ringer. A análise foi realizada após diferentes tempos e a porcentagem de células que capturaram o RNA-mhsp65-ORF foi determinado por FACS.

4.8.2 Análise por microscopia de fluorescência da capacidade de células pulmonares em capturar.

Para comprovar o processo de captura do RNA-mhsp65-ORF por células pulmonares, realizamos análises por microscopia de fluorescência nas células pulmonares de animais que receberam o RNA-mhsp65-ORF marcado com alexa 488. As figuras 38 e 39 mostram que as células pulmonares capturaram o RNA-mhsp65-ORF em todos os períodos analisados, comprovando nossos dados anteriores. Cabe ressaltar que como não houve dupla marcação não foi possível identificar as células que capturaram o RNA-mhsp65-ORF. Porém como pode ser visualizado nas figuras de sobreposição da fluorescência com o campo claro, existem células que não capturam o RNA-mhsp65-ORF marcado.

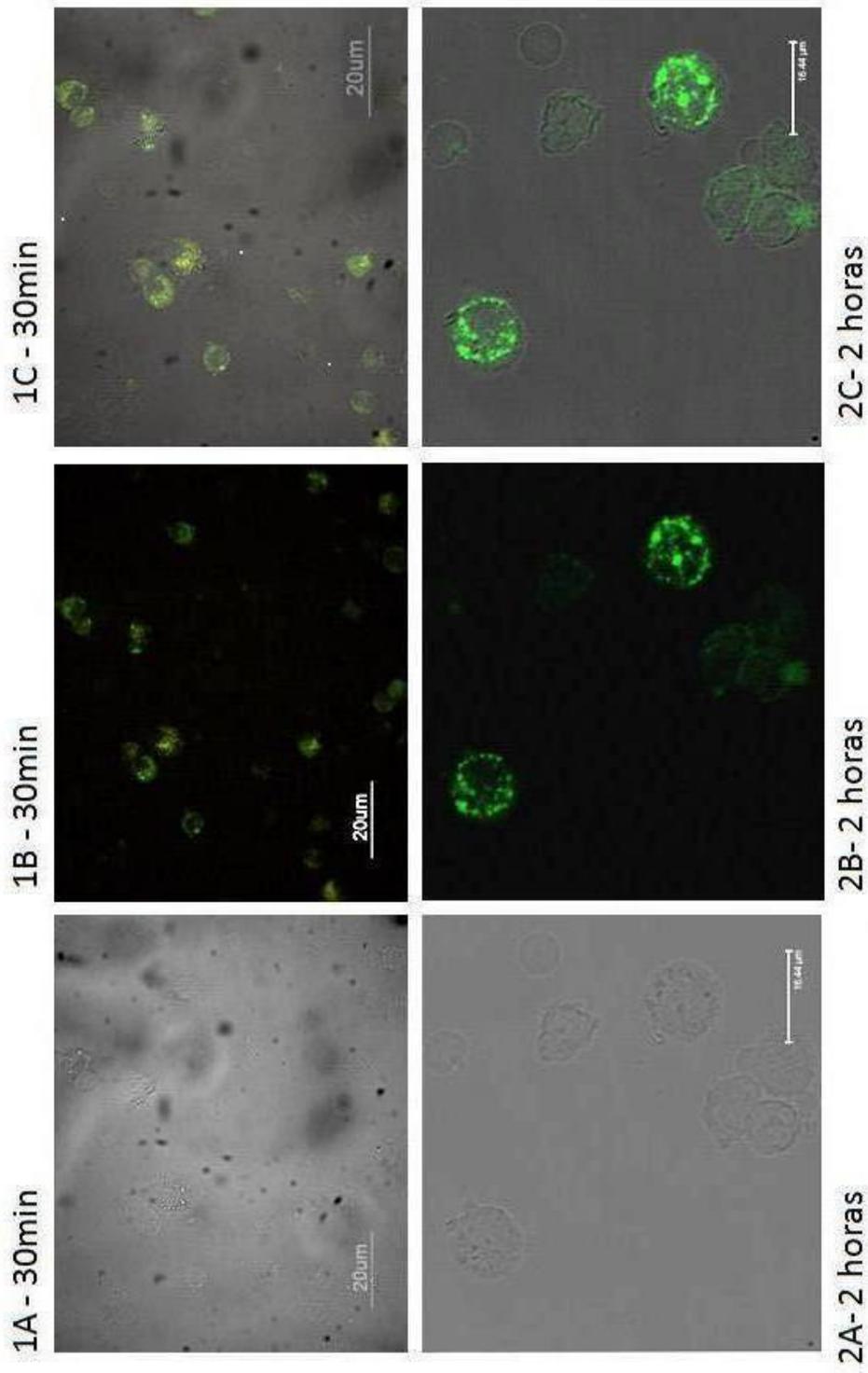


Figura 38. Detecção de RNA-mhsp65-ORF in vivo em células pulmonares. Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose de 10µg de mRNA-3A marcado com Alexa488. Após diferentes tempos. Os camundongos as células pulmonares foram processadas e montadas em lâminas preparadas para microscopia de fluorescência. 1 e 2 A – Correspondem ao campo claro, 1 e 2 B – Visualização em filtro alexa 488, 1 e 2 C – Correspondem a sobreposição de 1A/1B e 2A/2B respectivamente. As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência no aumento indicado nas figuras.

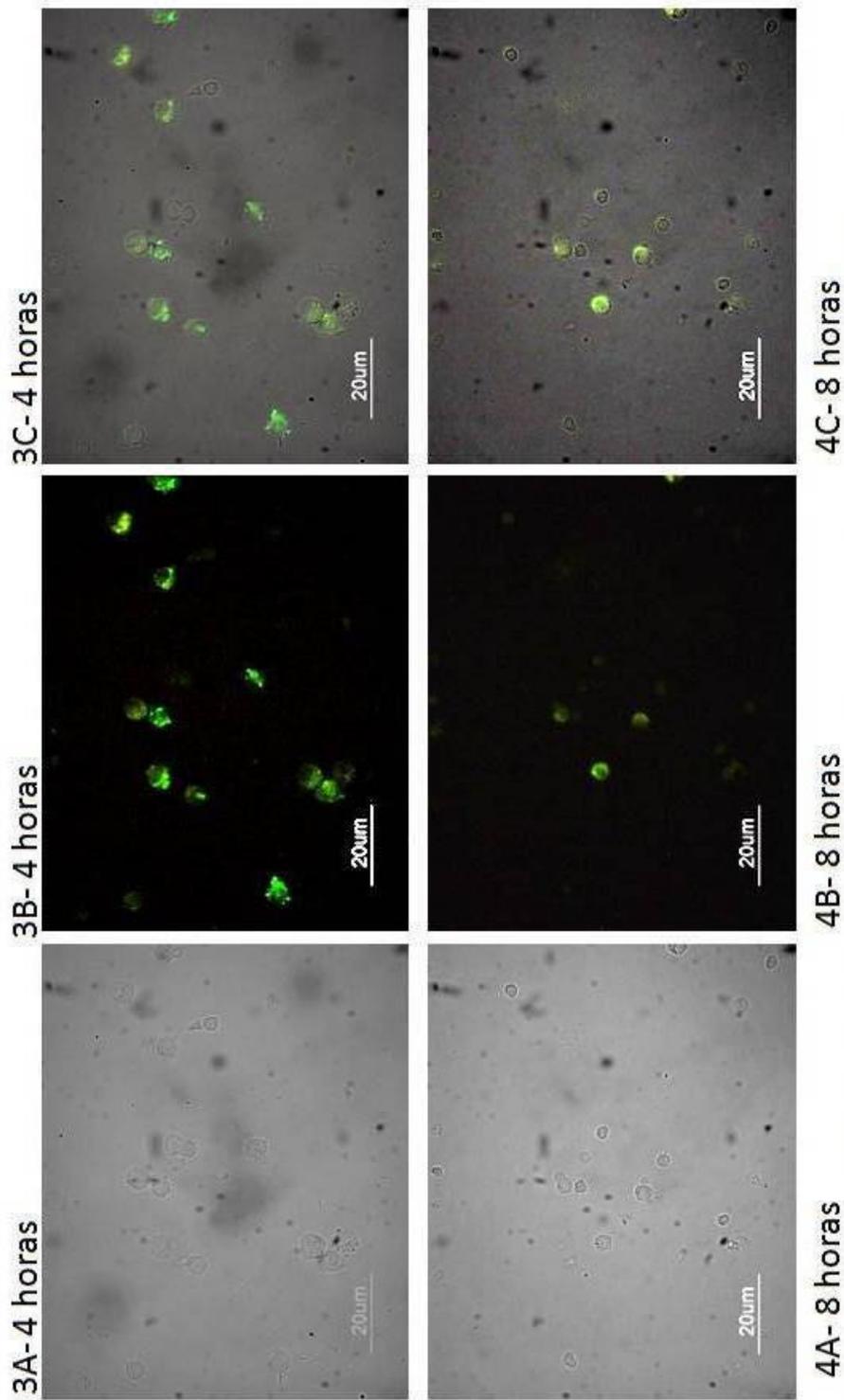


Figura 39. Detecção de RNA-mhsp65-ORF in vivo em células pulmonares. Camundongos Balb/C foram imunizados por via intranasal com uma dose de 10µg de mRNA-3A marcado com Alexa488. Após diferentes tempos. Os camundongos as células pulmonares foram processadas e montadas em lâminas preparadas para microscopia de fluorescência. 3 e 4 A – Correspondem ao campo claro, 3 e 4 B – Visualização em filtro alexa 488, 3 e 4 C – Correspondem a sobreposição de 3A/1B e 4A/2B respectivamente. As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência no aumento indicado nas figuras.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi mostrado que o uso de RNA mensageiro da Hsp65 de *M.leprae* induziu proteção contra a tuberculose experimental, quando inoculado pela via intranasal, mas não quando veiculado pela via intramuscular. Essa proteção não se mostrou efetiva quando o RNAm foi veiculado por via intranasal em lipossomas do tipo DOTAP. A proteção obtida foi acompanhada pela manutenção da integridade do tecido pulmonar e diminuição da expressão de GATA-3. Curiosamente não houve conexão entre a proteção e a presença de células T de memória e a produção de anticorpos anti-hsp56. Ficou demonstrado, também, que células apresentadoras de antígenos CD11C⁺, CD11B⁺ e CD19⁺, presentes no pulmão, foram capazes de capturar o RNA-mhsp65-ORF exógeno após injeção intranasal. Em conjunto esses dados sugerem que a estratégia aqui desenvolvida possa ser utilizada como vacina para outras doenças infecciosas e, abre perspectivas para o entendimento do mecanismo desencadeado pelo RNA-mhsp65-ORF para indução da resposta imune.

O processo de desenvolvimento de uma vacina, de forma geral, envolve diferentes passos, cujo resultado pode mudar drasticamente, dependendo da escolha da dose, do antígeno, da rota de imunização, do número de doses reforços (*booster*), etc. Assim, o caminho científico para a busca de uma melhor estratégia vacinal é multifatorial e, é preciso que cada análise se adéqüe a vacina estudada, o que resulta, muitas vezes, na utilização de diferentes estratégias de análise para obtenção de um resultado positivo.

Nesse sentido modelos experimentais têm sido estudados com intuito de se desenvolver vacinas eficientes para diferentes tipos de doenças, incluindo as vacinas recombinantes, as atenuadas e DNA (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000) até as mais recentes terapias com uso de células dendríticas hibridizadas com células tumorais (Barbutto, Ensina *et al.*, 2004; Neves, Ensina *et al.*, 2005), (Melhem, Liu *et al.*, 2007).

A vacinação com RNA mensageiro é uma técnica muito recente e, particularmente, direcionada para o tratamento de doenças neoplásicas (Kyte e Gaudernack, 2006). Na maioria desses estudos o RNAm é, inserido em células apresentadoras de antígeno para que essas possam efetuar seu potencial imunostimulatório. Ótimos resultados têm sido obtidos com a utilização dessas técnicas, inclusive com o início de diversos ensaios clínicos (Pascolo, 2008). Um exemplo

de sucesso dessa metodologia, é o uso células dendríticas de paciente portador de melanoma transfectadas *in vitro* com RNAm total do melanoma, e posteriormente injetada no paciente. Este tratamento induziu potente resposta de células T que culminou no aumento da sobrevida dos pacientes em estudo (Kyte, Kvalheim *et al.*, 2007).

A utilização de RNAm nu, isto é, injetado diretamente no organismo, sem proteção alguma, é outra técnica que tem sido utilizada na busca de uma forma de vacinação com ácidos nucléicos. Atualmente o principal grupo de pesquisa nessa área é a empresa Curevac (Germany) que estuda uma forma de estabilização do RNAm utilizado para vacinação (Pascolo, 2004), (Pascolo, 2006). Este RNAm “estabilizado” já foi utilizado em diversos testes de imunização, sendo o mais recente já testado em humanos para o estudo do expressão gênica de gene repórter da proteína Luciferase pela via de imunização subcutânea (Probst, Weide *et al.*, 2007).

Tendo em vista o uso do RNAm como molécula vacinal, codificando para a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* como objetivo central desse trabalho, a primeira análise realizada foi à verificação de nossas construções provenientes de plasmídeos, pois esses seriam utilizados como molde para a produção do RNAm utilizado no estudo.

As análises do seqüenciamento de nossos plasmídios nos mostraram que tínhamos toda a seqüência do gene da hsp65, tanto na forma completa, no plasmídeo pcDNA3-hsp65, quanto na forma de ORF no plasmídeo pcDNA-hsp65-3A em condições funcionais. Isso indicava que as seqüências estavam íntegras e apresentavam todos os sítios necessários para a iniciação e para a finalização da tradução do gene alvo. As análises da estrutura molecular dos RNAm nos mostrou que, como esperado, um RNAm menor tem uma melhor estabilidade, fato esse mostrado pelos valores de dG e que a estrutura molecular da região 5'UTR não continha nenhum fator que pudesse limitar a tradução do RNAm da hsp65 (figuras 12 e 13). Como comentado anteriormente, a confecção de RNAm *in vitro* requer muitos cuidados. A presença da cauda do pcDNA3-hsp65 não transcrita poderia ser um problema durante sua tradução, como indicada pela figura 12. Dessa forma, optamos por produzir RNA mensageiro proveniente apenas do plasmídeo pcDNA-hsp65-3A, principalmente após os dados de estabilidade das moléculas dados pelos ensaios *in silico*.

Os testes de estabilidade do RNAmhsp65-ORF, foram realizados após a transfecção desse em células HEK293. Na figura 14 podemos notar que o RNAmhsp65-ORF conseguiu ser

detectado até quatro horas depois de entrar nessas células pela estratégia de RT-PCR. Em períodos mais tardios como 8 horas esse RNAm pode ter sido traduzido em da hsp65 *in vitro* gerando a proteína ou ter sido degradado e logo levando a não detecção desse RNAm no RT-PCR após 4 horas. Esses dados da cinética de estabilidade do RNAm são compatíveis com a cinética da produção da proteína hsp65 detectada por *Western blot*, quando até quatro horas após o contato, foi possível se detectar a presença da proteína íntegra. A partir das 8 horas a proteína parece ser degradada, como sugerido pelo seu peso molecular no *Western blot* (Figura 15). Em conjunto esses dados comprovaram que o RNAm-hsp65-orf foi confeccionado e sintetizado corretamente e após a entrada nas células, foi capaz de produzir a proteína hsp65. Assim podemos inferir que *in vivo* a molécula de RNAm, ao entrar em células como linfócitos B, macrófagos e células dendríticas possa induzir a expressão da proteína hsp65. Além disso, podemos admitir, baseados nos resultados dos anticorpos e das citocinas, que a imunização intramuscular com RNA não foi eficiente em estimular clones de linfócito B e T específicos para a proteína hsp65. Em geral, para patógenos intracelulares como a micobactéria, a ativação da resposta mediada por linfócitos T é mais eficaz contra a infecção, como por exemplo na tuberculose (Silva, Silva *et al.*, 1996). O que chama a atenção em nossos experimentos é que não houve produção de nenhum dos isotipos de anticorpos ou das citocinas testados, sugerindo que o RNA mensageiro, aplicado por via intramuscular, tenha sido degradado e, conseqüentemente, não resultando no estímulo do sistema ímune. Essa hipótese é reforçada pelos resultados do ensaio de UFC onde os camundongos vacinados com RNAmhsp65-ORF, por via intramuscular, não mostraram uma diminuição significativa da carga bacilar. Em contra partida, os camundongos vacinados com BCG tiveram uma diminuição estatisticamente significativa da carga bacilar com uma diminuição de 1 log na quantidade de unidade formadoras de colônia. Optamos por usar BCG como controle positivo, desde que a mesma é uma vacina liberada para uso em humano. Assim, os resultados obtidos com a imunização usando BCG já eram esperados. Os resultados do ensaio de UFC foram confirmados pela análise histológica dos pulmões dos animais vacinados, onde foi possível detectar menor comprometimento do parênquima pulmonar apenas no grupo vacinado com BCG (figura 22), sendo que no grupo vacinado com três doses de ocorreu um grande comprometimento do parênquima pulmonar apresentando um intenso infiltrado

inflamatório difuso com presença de células mononucleares de localização intra-alveolar, edema e exudato fibrinoso.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar o não funcionamento dessa primeira estratégia. A rota de imunização tem sido um passo crucial na eficácia ou não de diferentes modelos vacinais. É possível que a via intramuscular não seja a melhor rota para se imunizar e/ou detectar a eficácia de uma vacina de RNA mensageiro. Fatores como a dificuldade de entrada do RNAm nos miócitos ou degradação por ribonucleases não podem ser descartados. Além disso, recentemente, um artigo de Probst, Weide e colaboradores (2007)(Probst, Weide *et al.*, 2007) mostraram que a internalização do RNAm, injetado na sua forma nu, por células residentes do sítio de injeção depende grandemente da presença de cálcio no veículo de injeção. Como os ensaios iniciais foram realizados sem a presença desse íon, esse fato também pode ter relação com a ineficácia de nossa primeira estratégia. Nesse mesmo artigo os autores testaram a solução de RINGER LACTATE, que é um veículo de injeções comumente utilizado em ambiente hospitalar. O uso dessa solução aumentou em quase mil vezes a expressão de luciferase no sítio da injeção.

Nessa linha de raciocínio, podemos inferir que o RNAm-hsp65-ORF administrado pode ter sido degradado no intervalo entre a injeção e o momento da captura por APCs ou pelos miócitos, como já comentado. A captura em baixas doses também pode dificultar a indução de uma resposta imune eficaz. Tal dificuldade é minimizada em vacinas de DNA plasmidial quando veiculada pela via intramuscular, desde que a dose total corresponde a 300-400 µg/camundongo, o que é muito diferente da dose utilizada em nossos ensaios. Assim, embora todas as hipóteses acima comentadas possam ter contribuído total ou parcialmente para a falência de nossos resultados é possível que o aumento da dose de RNAm administrado por via intramuscular nu ou encapsulado, possa levar a um bom estímulo do sistema imune, podendo até induzir proteção. No entanto, nossa premissa inicial, além de utilizar material genético que não incorporasse no genoma indivíduo vacinado, era buscar abordagens para diminuir a dose usada nas vacinas de DNA (De Paula, Silva *et al.*, 2007). Assim, optamos por buscar outra estratégia como comentado abaixo, para continuidade dos experimentos, antes de tentar um aumento na dose do RNAm-hsp65-ORF.

Recentemente alguns artigos investigando o papel imunoestimulatório de diferentes seqüências de RNA simples fita demonstraram que a utilização do RNA encapsulados em lipídeos pode levar a ativação da resposta imune. O encapsulamento de RNAm tem sido bem explorado por diversos grupos de pesquisa, sempre usando a mesma justificativa, o RNAm nu é muito susceptível a ação das ribonucleases e sua meia vida no ambiente extracelular é muito curta. No entanto, nossas preparações de RNAm ficavam estáveis por 6 meses a -70 °C (dados não mostrados), não sendo esse um problema em nossa estratégia.

O lipídeo mais utilizados nessas formulações é o lipídeo catiônico N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl],N,N-trimethylammonium methylsulfate comercialmente chamado DOTAP (Bourquin, Schmidt *et al.*, 2007) (Hamm, Heit *et al.*, 2007). O uso desse lipídeo não só pode proteger o RNAm da degradação pelas RNases, como também pode aumentar a internalização do RNAm, contido nesse lipídeo. Esse fato é muito importante para o efeito da estimulação imunológica pelo RNAm, pois os respectivos receptores de ativação como do tipo Toll 7 específicos para reconhecimento do RNA de simples fita, estão contidos em vesículas intracelulares.

Desse modo, foi delineada nossa próxima estratégia vacinal utilizando uma nova rota de administração, a intranasal, e utilizando um novo veículo de imunização, a solução de Ringer-Lactato. Além disso, foi realizado o encapsulamento do RNAm no lipídeo catiônico DOTAP contendo o RNAm-hsp65-ORF nas doses de 5 ou 10ug em uma única imunização.

Todas as imunizações foram formuladas em um volume final de 100ul sendo que foram administrados 50ul da solução vacinal em cada narina dos camundongos. Esse volume foi determinado devido à diluição do RNAm-hsp65-ORF que é determinante para o encapsulamento com DOTAP, sendo assim todos os grupos foram imunizados com o mesmo volume de solução vacinal.

Como demonstrado na figura 34 somente o grupo vacinado com uma dose de 10ug de RNAm-hsp65-ORF, inoculada pela via intranasal foi capaz de gerar uma resposta imune protetora com a diminuição de aproximadamente 1 log de diminuição da carga bacilar em comparação aos camundongos vacinados apenas com a solução de Ringer. Como pode ser também ser observado, na mesma figura, nenhuma das outras formulações testadas obtiveram esse resultado. Esses dados mostraram a eficácia do RNAm-hsp65-ORF quando veiculado pela

rota intranasal em estimular uma resposta imune protetora contra a tuberculose experimental. A princípio esperávamos que as formulações que continham o RNA-mhsp65-ORF encapsulado no lipossoma DOTAP tivessem sucesso nos experimentos de proteção, visto que o uso desse lipossoma para o encapsulamento de ácidos nucleicos em composições vacinais é comum, principalmente para o encapsulamento de plasmídeos (Gregoriadis, Bacon *et al.*, 2003), e mais recentemente, para RNA (Zohra, Chowdhury *et al.*, 2007). Nesse último caso os autores observaram um aumento na eficiência de transfecção do RNAm codificando para a proteína fluorescente verde. No entanto o uso desse lipossoma em formulações vacinais utilizando RNA mensageiro até o momento não havia sido testado. Dessa forma o nosso trabalho mostra dados inovadores nesse campo. Nossa hipótese para eficácia dessa formulação era baseada na premissa que os lipossomas protegeriam o RNAm da ação de RNases presentes no trajeto entre as fossas nasais e as células pulmonares e, quando chegasse ao alvo, isto é, as células pulmonares liberassem o RNAm de forma mais lenta e duradoura do que a formulação nua. Tendo em vista que o grupo vacinado somente com RNAm-hsp65-ORF não obteve sucesso no controle da TB, uma possível justificativa para esse fato pode estar relacionado com a forma de liberação no citoplasma das células que capturaram esse complexo. Um dos principais problemas com uso de sistemas de liberação é justamente a deficiência, que os mesmos apresentam *in vivo* para liberação da molécula que está sendo usada como vacina. Em algumas preparações lipossomais, as moléculas de ácido nucleico podem ficar entre a camada lipídica e não internamente da vesícula. Isso pode alterar seu formato, levando perda da ação da molécula para síntese proteica (Gregoriadis, Bacon *et al.*, 2002). Como esperado, nesse mesmo experimento os camundongos vacinados com BCG também tiveram uma redução significativa da carga bacilar em seus pulmões. Vale lembrar que cada camundongo vacinado com BCG recebeu uma dose da vacina por via subcutânea, constando de 5×10^5 bactérias. Assim os dados com o RNAm são bastante promissores, devido à dose e rota, quando comparado ao BCG.

A fim de comprovar os dados do ensaio de proteção foi realizada a análise histológica dos pulmões dos animais vacinados após trinta dias da infecção. A preservação do tecido pulmonar também favorece o modelo vacinal do RNAm pela via intranasal (figura 35). Um dos critérios para que uma vacina possa ser considerada ideal inclui a proteção contra o patógeno, na menor dose possível e manutenção da integridade do tecido alvo, no caso da tuberculose, o tecido

pulmonar. Dessa forma os pulmões dos animais imunizados e infectados com foram coletados e analisados trinta dias após o desafio. Como mostrado na figura 35 o grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal. O grupo de animais que só recebeu a solução de Ringer apresenta uma pneumonia tuberculosa com grande comprometimento do parênquima pulmonar. Os animais vacinados com RNAmhsp65-ORF encapsulado com DOTAP apresentaram também um grande comprometimento com pneumonia tuberculosa aparente. Já os grupos vacinados apenas com RNAm-hsp65-ORF nu parecem ter tido um menor comprometimento do parênquima pulmonar, principalmente nos animais vacinados com a maior dose de RNAm. O uso de RNAm nu foi eficiente em induzir resposta imune protetora sem levar a danos teciduais decorrentes de uma hiper-estimulação inespecífica do sistema imunitário. Embora nossos dados não nos permitam concluir nada sobre o efeito do RNAm como um fator do tipo PAMP, não podemos excluir que o mesmo também não ative o sistema imune de forma inespecífica, agindo também como um adjuvante.

Tendo em vista os bons resultados obtidos no experimento de proteção o próximo passo foi caracterizar a resposta imune gerada pelos modelos avaliados.

O potencial imunogênico da nova formulação foi analisado de várias maneiras. Primeiramente foi analisada a produção de anticorpos contra a proteína HSP65 codificada pelo RNAm-hsp65-ORF. Como é possível verificar pelas análises das figuras 23 e 24 não houve aumento nos níveis de anticorpos IgG1e IgG2A anti-hsp65 em nenhuma das estratégias vacinais sendo o RNAmhsp65-ORF encapsulado ou não, nem aos quinze ou trinta dias após a imunização. Do mesmo modo não detectamos níveis de IgA e IgM anti-hsp65 após a vacinação intranasal (figura 25 e 26), sugerindo que a proteína produzida não tenha sido liberada no meio extra celular onde poderia ser capturada por células B.

A importância dos anticorpos em patogenias onde os agentes etiológicos vivem intracelularmente e tem crescimento lento ainda é uma controvérsia na vacinologia. Teoricamente esses patógenos quando escondidos dentro das células ficam imunes a ação opsonizadora dos anticorpos e só são expostos quando da morte da célula hospedeira (Kaufmann, Baumann *et al.*, 2006). Por outro lado o potencial uso de anticorpos monoclonais como vacina teve resultados interessantes na proteção contra a tuberculose murina (Glatman-Freedman, 2003). Porém, nós

acreditamos que a ausência de anticorpos não interfira em nosso modelo de proteção, uma vez que houve redução da carga bacilar.

A fim de analisar a capacidade imunoestimulatória de nossas formulações após quinze dias da imunização foi avaliado através do protocolo de ELISA a produção das citocinas TNF-alfa, IL-12, IL-10 e IL-5 por células isoladas do baço e de linfonodos drenantes do pulmão. Como se pode analisar pelas figuras 27, 28, 29 e 30 as células desses tecidos linfóides não foram capazes de produzir quantidades significativamente maiores dessas citocinas após o estímulo com a proteína HSP65 recombinante. Por outro lado as mesmas células foram capazes de produzir essas citocinas após o estímulo com o estimulador policlonal Concanavalina A.

A geração de células de memória é um aspecto importante para o desenvolvimento de vacinas, assim após 30 dias da imunização avaliamos a presença dessa população no pulmão dos camundongos. Para esse experimento após 28 dias da primeira imunização, todos os camundongos imunizados com RNAmhsp65-ORF receberam uma nova dose de 10ug do RNAmhsp65-ORF novamente por via intranasal. Três dias após esse “*booster*” foi analisada por citometria de fluxo a porcentagem das sub-populações CD4 e CD8 com perfil de memória CD44 “hi” e CD62L “low” presentes nos pulmões desses animais além das quantidades totais de células T CD4 e CD8. O *booster* oferecido 2 dias antes da avaliação foi desenvolvido a fim de recrutar para o pulmão as células de memória antígeno específicas. Nossa hipótese era que, após essa re-estimulação, as células de memória presentes nos linfonodos drenantes do pulmão, ou da medula óssea deveriam povoar o mesmo. Como visto na figura 31 não ocorreu diferença significativa na quantidade total de células T CD4 e CD8 presentes nos pulmões desses camundongos. Porém como visto na figura 32, nos camundongos vacinados com 10ug de RNAm-hsp65-ORF encapsulado em DOTAP ocorreu um aumento da quantidade de células de memória da população CD4. Em todos os outros grupos não ocorreu o aumento dessa população. Curiosamente, na análise da população de memória CD8 observou-se uma diminuição nos grupos vacinados com 5ug de RNAmhsp65-ORF encapsulado e no grupo que recebeu 10ug de RNAm-hsp65-ORF nu. A importância da população de memória central T CD4 gerada após a vacinação já é bastante conhecida. Em infecções por micobactérias a importância dessa população ficou patente quando mostrou-se que essa população tem a capacidade de ativar toda a resposta imune pulmonar de

camundongos deficientes da enzima recombinase RAG após transferência adotiva e subsequente desafio (Kipnis, Irwin *et al.*, 2005). Outro trabalho dos mesmos autores caracterizou as subpopulações de células T CD8 após a imunização com uma formulação lipossomal que continha o antígeno MTb32 de *Mycobacterium tuberculosis*. Nesse trabalho mostrou-se que a indução de diversos subtipos de células T CD8 com grande importância para as células de memória (Irwin, Izzo *et al.*, 2005).

Como nossa vacina teve bons resultados no protocolo de proteção, esperávamos conseguir avaliar a indução de subpopulações de células T de memória. Porém, vários fatores podem estar envolvidos nos dados obtidos. Uma explicação plausível para o fenômeno observado pode ser decorrente do tempo de análise 48 horas após o desafio (*booster*). É possível considerar que nesse período não houve tempo suficiente para o recrutamento dessas células para o tecido pulmonar. Outra hipótese aventada é que a população de memória que estaria aumentada, após a vacinação com RNA nu, não seria a que caracterizamos. Isso justificaria o fato de que a formulação com Dotap 10 µg de ter induzido linfócitos T CD4 de memória, mas não ter sido capaz de induzir proteção após o desafio.

Esses dados evidenciam a dificuldade de se correlacionar memória imunológica e proteção na maioria dos ensaios vacinais. A plasticidade do sistema imune leva a formação de diferentes subpopulações de memória (Stemberger, Huster *et al.*, 2007). É provável que a quantidade, assim como o tipo do antígeno e sua permanência no organismo interfiram nessa geração diferencial. Dessa forma, como nossos ensaios podem ser considerados pioneiros com relação ao uso de RNAm em vacinas contra doenças infecciosas, a proteção, obtida após o desafio, pode ser considerado como um parâmetro ideal.

Um dado interessante, obtido após o término da vacinação foi dado pela análise da expressão de fatores de transcrição GATA-3 e T-BET, no pulmão dos animais. Esses fatores foram escolhidos uma vez que sua expressão induz a produção de citocinas de padrões Th1 ou Th2 respectivamente, o que nos permitiria inferir sobre o tipo de resposta imune induzida após a vacinação. Pelos dados mostrados na figura 33 podemos notar que os grupos Ringer, Ringer/Dotap e BCG tiveram uma produção de GATA-3 superior ao T-BET, sugerindo a indução de um padrão do tipo Th2. Por outro lado, o grupo de RNAm-hsp65-ORF nu, embora não tenha induzido a expressão de T-BET nessa fase, apresenta níveis menores de GATA-3. Esses dados

sugerem que a vacinação com o RNAm-hsp65-ORF nu, pela via intranasal, foi capaz de sustentar uma resposta imune por trinta dias, tempo do desafio, com um padrão mais do tipo misto e/ou tendendo ao Th2, o que pode estar relacionado com a proteção observada. Curiosamente embora tenha sido possível detectar a expressão desses fatores de transcrição não observamos sucesso na dosagem das citocinas por ELISA. As formulações com que continham Dotap e o grupo BCG mostram um efeito acentuado do padrão misto (Th1/Th2), com elevados níveis de GATA3. Tais resultados corroboram com as análises histológicas, onde a presença de necrose e dano tecidual ficou restrita ao controle positivo e, em menor proporção, nas formulações que continham Dotap. O grupo BCG também induziu maior lesão pulmonar quando comparado ao RNAm-hsp65-ORF nu. Assim a presença de um padrão do tipo Th2 ou misto na fase do desafio pode levar ao agravamento da doença, embora, em algumas circunstâncias se observe redução de CFU. Esses dados são muito importantes para o design de vacinas eficientes, onde a eficácia não seja vista apenas como uma ótima ativação do sistema imunitário, mas também com a não indução de lesão tecidual.

Tendo em vista os resultados obtidos com a vacina de RNAm-hsp65-ORF nu no protocolo de proteção, o próximo passo realizado foi uma análise da captura do RNAmhsp65-ORF por células presentes no tecido pulmonar, visando esclarecer alguns dos mecanismos envolvidos no processo de ativação do sistema imune. Na figura 36 foi mostrada uma análise em relação a porcentagem de cada tipo celular envolvido na captura do RNAm, além da contagem total de cada tipo celular presente no pulmão dos camundongos após a administração do RNAm. Nessa análise pode-se perceber que a captura do RNAm-hsp65-ORF ocorreu em todos os tempos testados e por todas as subpopulações analisadas. Já na figura 37 onde são mostrados em números totais a quantidade de células que efetivamente capturaram o RNAm-hsp65-ORF, percebe-se que principalmente células dendríticas realizam esse papel. O recrutamento dessas células ocorre entre 30 minutos e 4 horas após a administração do RNAm marcado. Após 8 horas a quantidade de todas as células diminui. Porém quando analisamos a porcentagem de células que efetivamente capturaram o RNAm-hsp65-ORF do total de células analisadas, percebemos que as células B, embora presentes em menor quantidade, também capturam essa molécula de forma eficiente. Esse fato foi bem demonstrado após 4 horas da imunização do RNAm-hsp65-ORF marcado, quando aproximadamente 33% das células B

analisadas continham RNAm marcado em seu interior. Nessa mesma análise também se percebeu que 39% das células dendríticas analisadas apresentavam RNAmhsp65-ORF no seu interior. Dessa forma, podemos sugerir que células B, macrófagos e células dendríticas possam atuar como células apresentadoras de antígenos após a captura do RNA mensageiro. Confirmando dados anteriores sobre a captura de ácidos nucleicos por células B (Coelho-Castelo, Santos Junior *et al.*, 2003). No entanto, não podemos excluir que a captura desse RNA, também possa agir como imunoestimulante no sistema imune, através da ligação de receptores do tipo Toll (Scheel, Teufel *et al.*, 2005). Além disso, como não houve produção de anticorpos específicos a captura por células B não deve envolver o receptor BCR reiterando a idéia de uma possível ativação imunoestimulatória do RNAm em outro receptor presente nessa célula.

Outro ponto analisado foi a quantificação total dos tipos celulares presentes nos pulmões após os vários tempos de imunização. Essa análise foi importante, pois verificamos que, como esperado, a maior população presente no pulmão é a de macrófagos, que apresenta um aumento de um modo tempo dependente após a inoculação do RNAm (Figura 36). Podemos assim inferir que após a captura por células do sistema imune ou mesmo por interação direta na matriz extracelular, o RNA mensageiro possa desencadear a ativação celular com liberação de fatores quimioatraentes para as células apresentadoras de antígeno, ativando o sistema imune e obtendo resposta imune protetora

Com a finalidade de validar a captura do RNAm-hsp65-ORF determinada por citometria de fluxo, foram realizados experimentos usando microscopia de fluorescência. Nas fotos mostradas nas figuras 38 e 39 foi possível se visualizar diferentes intensidades de fluorescência dentro das células pulmonares que capturaram o RNAm-hsp65-ORF. Após 30 minutos da administração intranasal do RNAm, essas moléculas parecem estar distribuídas em grandes vesículas distribuídas por todo o interior da célula. Duas horas após as vesículas parecem estar mais focalizadas em menores pontos dentro da célula. Com quatro horas as vesículas aparecem em menor quantidade e a fluorescência parece estar mais difusa. Após oito horas não foi possível mais diferenciar se as moléculas marcadas estavam em vesículas ou dispersas no interior da célula. A fluorescência aparece difusa e bem fraca por toda célula, sugerindo que a molécula esteja agora disponível para a transcrição ou, então, possivelmente esteja sendo degradada. Na busca de dados científicos para suporte dos nossos resultados quanto a captura do RNA

mensageiro, encontramos um trabalho publicado em 2007 por Pascolo e colaboradores, já citado anteriormente que utilizaram um RNAm codificando para a enzima luciferase em injeções na orelha de camundongos. Nesse trabalho os autores realizaram alguns experimentos a fim de entender a captura do RNAm no sítio de injeção. O primeiro dado relevante é que nesse sistema a captura do RNAm tem um mecanismo dependente de cálcio. Fato esse comprovado quando da utilização da solução de ringer como veículo de injeção, nesse teste a expressão da luciferase foi 1000 vezes maior em comparação com o uso de PBS como veículo de injeção. Outro dado importante é que esse mecanismo de captura é saturável e é compartilhado por qualquer tipo de ácido nucléico. Um dado importante desse mesmo trabalho foi o teste da injeção de diferentes quantidades de RNAm, quando foi possível a demonstração que o pico de expressão da luciferase não muda quando administrados de 5 a 80ug de RNAm comprovando a saturação do mecanismo de captura dessa molécula. Porém ao contrário de nossos resultados, Pascolo e colaboradores identificaram outros tipos de célula capazes de capturar o RNAm. Ficou demonstrado que a maioria das células que capturaram o RNAm na orelha dos camundongos eram MHC de Classe II negativo, logo essas células não são apresentadoras de antígeno devendo ser principalmente queratinócitos e fibroblastos. Desse modo nosso trabalho foi o primeiro a caracterizar que o RNAm exógeno pode ser capturado *in vivo* por diferentes células apresentadoras de antígeno presentes no pulmão como capazes de captura RNAm exógeno. De qualquer modo, fica claro que dependendo da rota e das células envolvidas na captura do RNAm pode-se obter resultados bastante diferentes.

As análises da captura do RNAmhsp65-ORF marcado pelas células presentes no pulmão nos permitem concluir que nossa metodologia de administração do RNAm vacinal foi eficiente. No princípio do trabalho tínhamos dúvidas quando a possibilidade da degradação total do RNAm no percurso entre as narinas e as células pulmonares capazes de capturar o mesmo. Um fato que nos chama a atenção é a grande porcentagem de células pulmonares que capturam o RNAmhsp65-ORF. A opção da rota intranasal para a segunda estratégia vacinal se demonstrou acertada pelos resultados obtidos. Além disso, a vacinologia atual tem buscado novas vacinas que tenham uma única dose e que fujam da rota que necessita de materiais invasivos como agulhas. Nesse sentido a rota intranasal é uma opção interessante, visto que associado as vias áreas está presente o tecido linfóide nasal associado (NALT) que tem um grande potencial de indução de resposta

imune humoral e celular (Costantino, Illum *et al.*, 2007). A imunização intranasal leva ao desenvolvimento de uma imunidade local, assim como sistêmica. Embora nossas análises com células do baço para detecção do perfil de citocinas não tenham resultados satisfatórios podemos atribuir tais resultados a falta de conhecimento sobre os diferentes mecanismos de ação de uma molécula de RNAm proveniente de um organismo procarioto nas células eucarióticas. Assim, os experimento de captura abrem perspectivas para novas abordagens visando a ação da molécula de RNA mensageiro e da proteína produzida, através da avaliação da co-localização dessa molécula com receptores na superfície celular ou em endossomos e, em períodos quando a proteína já tenha sido codificada. Essas análises nos permitirão esclarecer e separar a ação antígeno-específica de uma ação imunomodulatória, realizada pelo RNA mensageiro.

Com base em nossos resultados podemos sugerir que o uso da molécula de RNA mensageiro como vacina tem um grande potencial a ser explorado em estratégias vacinais podendo se estender para doenças infecciosas ou outros tipos de patologia, incluindo terapias.

6. Conclusões

Em conjunto, os dados obtidos nos permitem concluir que o uso de um RNAm de um agente procariótico como vacina é uma estratégia funcional. Para tanto, a melhor rota, em nosso modelo, foi a intranasal. A molécula de RNAm em contato com o tecido eucariótico é capturada por várias células apresentadoras de antígeno podendo induzir resposta imune. Além disso, a escolha da melhor estrutura de RNAm é importante para a manutenção da estabilidade do mesmo possibilitando a ativação do sistema imune.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberle, J. H., S. W. Aberle, *et al.* Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. J Virol, v.79, n.24, Dec, p.15107-13. 2005.
- Absher, M. e W. R. Stinebring. Toxic properties of a synthetic double-stranded RNA. Endotoxin-like properties of poly I. poly C, an interferon stimulator. Nature, v.223, n.5207, Aug 16, p.715-7. 1969.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature, v.413, n.6857, Oct 18, p.732-8. 2001.
- Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol, v.215, n.3, Oct 5, p.403-10. 1990.
- Babendure, J. R., J. L. Babendure, *et al.* Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. Rna, v.12, n.5, May, p.851-61. 2006.
- Barbuto, J. A., L. F. Ensina, *et al.* Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. Cancer Immunol Immunother, v.53, n.12, Dec, p.1111-8. 2004.
- Boczkowski, D., S. K. Nair, *et al.* Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. J Exp Med, v.184, n.2, Aug 1, p.465-72. 1996.
- Bonato, V. L., V. M. Lima, *et al.* Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice. Infect Immun, v.66, n.1, Jan, p.169-75. 1998.
- Bourquin, C., L. Schmidt, *et al.* Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2A response. Blood, v.109, n.7, Apr 1, p.2953-60. 2007.
- Bryant, P. W., A. M. Lennon-Dumenil, *et al.* Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules. Adv Immunol, v.80, p.71-114. 2002.
- Carralot, J. P., J. Probst, *et al.* Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines. Cell Mol Life Sci, v.61, n.18, Sep, p.2418-24. 2004.
- Carter, K. C., F. L. Henriquez, *et al.* DNA vaccination against the parasite enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase confers protection against Leishmania donovani infection. Vaccine, v.25, n.22, May 30, p.4502-9. 2007.

Chou, B., H. Hisaeda, *et al.* Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. Microbes Infect, Dec 5. 2007.

Coelho-Castelo, A. A., R. R. Santos Junior, *et al.* B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. Hum Gene Ther, v.14, n.13, Sep 1, p.1279-85. 2003.

Coelho-Castelo, A. A., A. P. Trombone, *et al.* Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. Genet Vaccines Ther, v.4, p.1. 2006.

Conry, R. M., A. F. Lobuglio, *et al.* Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. Cancer Res, v.55, n.7, Apr 1, p.1397-400. 1995.

Costantino, H. R., L. Illum, *et al.* Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. Int J Pharm, v.337, n.1-2, Jun 7, p.1-24. 2007.

De Paula, L., C. L. Silva, *et al.* Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. Genet Vaccines Ther, v.5, p.2. 2007.

Diebold, S. S., T. Kaisho, *et al.* Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science, v.303, n.5663, Mar 5, p.1529-31. 2004.

Doe, B., M. Selby, *et al.* Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.16, Aug 6, p.8578-83. 1996.

Donnelly, J., K. Berry, *et al.* Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. Int J Parasitol, v.33, n.5-6, May, p.457-67. 2003.

Friedman, H. Discussion paper: protective immunity in leukemic mice treated with specific "immunogenic" RNA. Ann N Y Acad Sci, v.277, n.00, p.708-15. 1976.

Fritze, D., D. H. Kern, *et al.* Transfer of tumor specific immunity with "immune" RNA: prospects for the treatment of human cancer. Klin Wochenschr, v.54, n.18, Sep 15, p.851-63. 1976.

Gilkeson, G. S., A. M. Pippen, *et al.* Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. J Clin Invest, v.95, n.3, Mar, p.1398-402. 1995.

Glatman-Freedman, A. Advances in antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy. FEMS Immunol Med Microbiol, v.39, n.1, Oct 24, p.9-16. 2003.

- Gordon, D., C. Abajian, *et al.* Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Res, v.8, n.3, Mar, p.195-202. 1998.
- Gregoriadis, G., A. Bacon, *et al.* A role for liposomes in genetic vaccination. Vaccine, v.20 Suppl 5, Dec 20, p.B1-9. 2002.
- Gregoriadis, G., Bacon, A., Caparros-Wanderley, W., McCormack, B. Plasmid DNA vaccines: entrapment into liposomes by dehydration-rehydration. Methods Enzymol, v.367, p.70-80. 2003.
- Gurunathan, S., D. M. Klinman, *et al.* DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. Annu Rev Immunol, v.18, p.927-74. 2000.
- Hamm, S., A. Heit, *et al.* Immunostimulatory RNA is a potent inducer of antigen-specific cytotoxic and humoral immune response in vivo. Int Immunol, v.19, n.3, Mar, p.297-304. 2007.
- Helke, A., R. M. Geisen, *et al.* An unstructured mRNA region and a 5' hairpin represent important elements of the E. coli translation initiation signal determined by using the bacteriophage T7 gene 1 translation start site. Nucleic Acids Res, v.21, n.24, Dec 11, p.5705-11. 1993.
- Hoerr, I., R. Obst, *et al.* In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. Eur J Immunol, v.30, n.1, Jan, p.1-7. 2000.
- Huygen, K. Plasmid DNA vaccination. Microbes Infect, v.7, n.5-6, May, p.932-8. 2005.
- Irwin, S. M., A. A. Izzo, *et al.* Tracking antigen-specific CD8 T lymphocytes in the lungs of mice vaccinated with the Mtb72F polyprotein. Infect Immun, v.73, n.9, Sep, p.5809-16. 2005.
- Kaufmann, S. H., S. Baumann, *et al.* Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis, v.10, n.10, Oct, p.1068-79. 2006.
- Kipnis, A., S. Irwin, *et al.* Memory T lymphocytes generated by Mycobacterium bovis BCG vaccination reside within a CD4⁺CD44^{lo}CD62⁺LIgA⁺ population. Infect Immun, v.73, n.11, Nov, p.7759-64. 2005.
- Kita, E. e S. Kashiba. Immunogenicity of transfer RNA isolated from a two-heptose rough mutant of Salmonella typhimurium LT2 in mouse typhoid infection. Immunology, v.50, n.3, Nov, p.369-76. 1983.
- Klinman, D. M., M. Takeno, *et al.* DNA vaccines: safety and efficacy issues. Springer Semin Immunopathol, v.19, n.2, p.245-56. 1997.

Koski, G. K., K. Kariko, *et al.* Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. J Immunol, v.172, n.7, Apr 1, p.3989-93. 2004.

Kozak, M. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.9, May, p.2850-4. 1986.

Kyte, J. A. e G. Gaudernack. Immuno-gene therapy of cancer with tumour-mRNA transfected dendritic cells. Cancer Immunol Immunother, v.55, n.11, Nov, p.1432-42. 2006.

Kyte, J. A., G. Kvalheim, *et al.* T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells. Cancer Immunol Immunother, v.56, n.5, May, p.659-75. 2007.

Lemos, M. V. e H. Menezes. The effect of an immune RNA (RNAi) against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Tropenmed Parasitol, v.29, n.1, Mar, p.119-26. 1978.

Lima, K. M., V. L. Bonato, *et al.* Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. Vaccine, v.19, n.25-26, May 14, p.3518-25. 2001.

Lima, K. M., S. A. Dos Santos, *et al.* Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. Vaccine, v.22, n.1, Dec 8, p.49-56. 2003.

Lowrie, D. B., C. L. Silva, *et al.* Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. Vaccine, v.15, n.8, Jun, p.834-8. 1997.

Lowrie, D. B., R. E. Tascon, *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature, v.400, n.6741, Jul 15, p.269-71. 1999.

Mandl, C. W., J. H. Aberle, *et al.* In vitro-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model. Nat Med, v.4, n.12, Dec, p.1438-40. 1998.

Martinon, F., S. Krishnan, *et al.* Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. Eur J Immunol, v.23, n.7, Jul, p.1719-22. 1993.

Melhem, N. M., X. D. Liu, *et al.* Robust CD4+ and CD8+ T cell responses to SIV using mRNA-transfected DC expressing autologous viral Ag. Eur J Immunol, v.37, n.8, Aug, p.2164-73. 2007.

Murad, J. M., L. R. De Souza, *et al.* PKR activation by a non-coding RNA expressed in lymphocytes of mice bearing B16 melanoma. Blood Cells Mol Dis, v.37, n.2, Sep-Oct, p.128-33. 2006.

Neves, A. R., L. F. Ensina, *et al.* Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and

- induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. Cancer Immunol Immunother, v.54, n.1, Jan, p.61-6. 2005.
- Nishiya, T., E. Kajita, *et al.* TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. J Biol Chem, v.280, n.44, Nov 4, p.37107-17. 2005.
- Pascolo, S. Messenger RNA-based vaccines. Expert Opin Biol Ther, v.4, n.8, Aug, p.1285-94. 2004.
- Pascolo, S. Vaccination with messenger RNA. Methods Mol Med, v.127, p.23-40. 2006.
- Pascolo, S. Vaccination with messenger RNA (mRNA). Handb Exp Pharmacol, n.183, p.221-35. 2008.
- Probst, J., B. Weide, *et al.* Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. Gene Ther, v.14, n.15, Aug, p.1175-80. 2007.
- Qiu, P., P. Ziegelhoffer, *et al.* Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. Gene Ther, v.3, n.3, Mar, p.262-8. 1996.
- Rigby, P. G. Restoration of allograft immunity in tumor-bearing animals by "immune" RNA. J Lab Clin Med, v.71, n.5, May, p.775-83. 1968.
- Rock, K. L., I. A. York, *et al.* Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. Adv Immunol, v.80, p.1-70. 2002.
- Sanguino, A., G. Lopez-Berestein, *et al.* Strategies for In Vivo siRNA Delivery in Cancer. Mini Rev Med Chem, v.8, n.3, Mar, p.248-55. 2008.
- Scheel, B., R. Teufel, *et al.* Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. Eur J Immunol, v.35, n.5, May, p.1557-66. 2005.
- Schlager, S. I., R. E. Paque, *et al.* Complete and apparently specific local tumor regression using syngeneic or xenogeneic "tumor-immune" RNA extracts. Cancer Res, v.35, n.8, Aug, p.1907-14. 1975.
- Silva, C. L., M. F. Silva, *et al.* Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. Infect Immun, v.64, n.7, Jul, p.2400-7. 1996.
- Steele, G., Jr., B. S. Wang, *et al.* Results of xenogeneic I-RNA therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. Cancer, v.47, n.6, Mar 15, p.1286-8. 1981.

- Steitz, J., C. M. Britten, *et al.* Effective induction of anti-melanoma immunity following genetic vaccination with synthetic mRNA coding for the fusion protein EGFP.TRP2. Cancer Immunol Immunother, v.55, n.3, Mar, p.246-53. 2006.
- Stemberger, C., K. M. Huster, *et al.* A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. Immunity, v.27, n.6, Dec, p.985-97. 2007.
- Tatusova, T. A. e T. L. Madden. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol Lett, v.174, n.2, May 15, p.247-50. 1999.
- Tesoro-Cruz, E., R. Calderon-Rodriguez, *et al.* Intradermal DNA vaccination in ear pinnae is an efficient route to protect cats against rabies virus. Vet Res, v.39, n.2, Mar-Apr, p.16. 2008.
- Trombone, A. P., C. L. Silva, *et al.* Endocytosis of DNA-Hsp65 Alters the pH of the Late Endosome/Lysosome and Interferes with Antigen Presentation. PLoS ONE, v.2, n.9, p.e923. 2007.
- Ulmer, J. B. An update on the state of the art of DNA vaccines. Curr Opin Drug Discov Devel, v.4, n.2, Mar, p.192-7. 2001.
- Vassilev, V. B., L. H. Gil, *et al.* Microparticle-mediated RNA immunization against bovine viral diarrhea virus. Vaccine, v.19, n.15-16, Feb 28, p.2012-9. 2001.
- Vincze, T., J. Posfai, *et al.* NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res, v.31, n.13, Jul 1, p.3688-91. 2003.
- Watson, J. D. Involvement of RNA in the synthesis of proteins. Science, v.140, Apr 5, p.17-26. 1963.
- Wells, P. W., J. M. Sharp, *et al.* The assessment in sheep of an inactivated vaccine of parainfluenza 3 virus incorporating double stranded RNA (BRL 5907) as adjuvant. J Hyg (Lond), v.77, n.2, Oct, p.255-61. 1976.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science, v.247, n.4949 Pt 1, Mar 23, p.1465-8. 1990.
- Xue, T., E. Stavropoulos, *et al.* RNA encoding the MPT83 antigen induces protective immune responses against Mycobacterium tuberculosis infection. Infect Immun, v.72, n.11, Nov, p.6324-9. 2004.
- Zhou, W. Z., D. S. Hoon, *et al.* RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. Hum Gene Ther, v.10, n.16, Nov 1, p.2719-24. 1999.

Zhou, X., P. Berglund, *et al.* Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. Vaccine, v.12, n.16, Dec, p.1510-4. 1994.

Zohra, F. T., E. H. Chowdhury, *et al.* Effective delivery with enhanced translational activity synergistically accelerates mRNA-based transfection. Biochem Biophys Res Commun, v.358, n.1, Jun 22, p.373-8. 2007.

Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res, v.31, n.13, Jul 1, p.3406-15. 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)