

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**Avaliação de uma nova metodologia vacinal baseada
no uso de RNA mensageiro na
tuberculose experimental**

CAROLINA DAMAS ROCHA

RIBEIRÃO PRETO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CAROLINA DAMAS ROCHA

**Avaliação de uma nova metodologia vacinal baseada
no uso de RNA mensageiro na
tuberculose experimental**

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de
Concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Arlete A. M. Coelho-Castelo

RIBEIRÃO PRETO

2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto-USP

Rocha, Carolina Damas.

Avaliação de uma nova metodologia vacinal baseada no uso de RNA mensageiro na tuberculose experimental - Ribeirão Preto, 2009. 184 pp. 28 cm

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra.: Arlete A. Martins Coelho-Castelo.

1. APCs. 2. mRNA-Hsp65 3. Vacinação 4. Tuberculose

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE IMUNOTERAPIA GÊNICA, PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, COM AUXÍLIO FINANCEIRO DA FAPESP - 2006/01242-4.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

***Dedico aos meus pais, Darci e Maria, e à minha irmã Ellen, pelo
apoio e incentivo incondicionais.
Ao meu Luis pelo amor, confiança e companheirismo.***

“Não se preocupe em entender. Viver ultrapassa todo entendimento”.

Clarisse Lispector

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dra. Arlete A. Martins Coelho-Castelo pela oportunidade, orientação e confiança, que contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica;

À Dra Ana Paula Favaro Trombone pela amizade, companheirismo e ajuda imprescindível para a realização desse trabalho;

Ao professor Célio Lopes Silva pelo fornecimento de infra-estrutura e ferramentas e por abrir a porta de seu laboratório para a realização de parte desse trabalho;

À professora Dr^a. Vânia Luiza Deperon Bonato também pela disponibilidade de seu laboratório para execução de parte do trabalho;

Ao professor Luis Tosi pela disponibilidade de equipamentos fundamentais para execução desse trabalho;

Ao Dr. Carlos Rodrigo pelas sugestões e discussões muito construtivas, sobretudo na finalização desse trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Imunoterapia Gênica, Luciana, Isabela, Ricardo, Thiago, Renata, Everton, José Eduardo e Giuliana pela convivência e colaboração. Também aos amigos dos Laboratórios do professor Dr. Célio Lopes Silva e da

professora Dr^a. Vânia Luiza Deperon Bonato: Rodrigo, Rogério, Patrícia, Wendy, Denise, Paola, Cássia, Luis Henrique e Lívia. Aos alunos que já saíram, mas com quem convivi Willian, Marina, Pryscilla, Rubens, Giovanna e Alan. Ao Júlio pela amizade e pela ajuda durante para realização desse trabalho;

À Ana Flávia, Iza e Aninha pela amizade, disponibilidade e imensa ajuda;

Ao Walter e à Fabiana pela colaboração nos experimentos de citometria de fluxo;

Aos colegas e docentes do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada;

À secretária Ana Cristine por quem tenho grande carinho, por todo seu apoio, auxílio e amizade;

Às agências financiadoras FAPESP, FAEPA e CNPq.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 - Tuberculose e Vacinas de DNA | 1 |
| 1.2 - Vacinas de DNA, Resposta imune e APCs | 4 |
| 1.3 - Vacinas de RNA..... | 12 |
| 2 - OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 - Geral | 18 |
| 2.2 - Específicos..... | 18 |
| 3 - MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 - Obtenção dos plasmídeos recombinantes pcDNA3A-Hsp65 e pcDNA3..... | 20 |
| 3.2 - Quantificação dos plasmídeos purificados | 21 |
| 3.3 - Avaliação da integridade dos plasmídeos | 21 |
| 3.4 - Confeção dos iniciadores (<i>primers</i>) e sequenciamento do inserto da Hsp65 presente nos plasmídeos pcDNA3 e pcDNA3A-Hsp65 | 22 |
| 3.5 - Obtenção do RNA mensageiro codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> | 23 |
| 3.6 - Quantificação do RNA mensageiro codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> | 24 |
| 3.7 - Avaliação da integridade do RNA mensageiro codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> | 24 |
| 3.8 - Avaliação da integridade dos RNAs mensageiros da proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> após a transfecção de células HEK 293, por RT-PCR..... | 25 |
| 3.9 - Obtenção da proteína Hsp65 recombinante..... | 27 |
| 3.10 - Avaliação <i>in vitro</i> da expressão da proteína Hsp65 por Western blotting | 28 |
| 3.11 - Animais | 30 |
| 3.12 - Obtenção de macrófagos peritoneais (M ϕ s) e linfócitos B (LBs)..... | 30 |
| 3.13 - Obtenção das células dendríticas (CDs) provenientes da medula óssea | 31 |
| 3.14 - Eletroporação dos macrófagos peritoneais, dos linfócitos B e das células dendríticas com mRNA-Hsp65..... | 31 |
| 3.15 - Marcação do RNA mensageiro (mRNA-Hsp65) para os ensaios de eletroporação..... | 32 |
| 3.16 - Fenotipagem dos macrófagos peritoneais, dos linfócitos B e das células dendríticas | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 3.17 - Preparo das APCs para os ensaios de imunogenicidade | 34 |
| 3.18 - Ensaio de imunogeninidade | 35 |
| 3.19 - Marcação das células com CFSE | 35 |
| 3.20 - Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE..... | 36 |
| 3.21 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos | 36 |
| 3.22 - Cultura de células do baço (ensaio de imunogenicidade)..... | 37 |
| 3.23 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas | 37 |
| 3.24 - Preparo das APCs para os ensaios profiláticos e terapêuticos..... | 38 |
| 3.25 - Determinação da viabilidade da cepa micobacteriana | 39 |
| 3.26 - Infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e vacinação dos animais com as diferentes abordagens profiláticas e terapêuticas..... | 40 |
| 3.27 - Avaliação do pulmão dos animais infectados..... | 41 |
| 3.28 - Obtenção do homogenato do pulmão | 42 |
| 3.29 - Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) | 42 |
| 3.30 - Análise histológica dos pulmões | 42 |
| 3.31 - Análise morfométrica dos pulmões | 43 |
| 3.32 - Análise estatística | 43 |
| 4 – RESULTADOS..... | 44 |
| 4.1 - Avaliação da integridade e sequenciamento dos plasmídeos utilizados como molde para a produção de mRNA-Hsp65 | 44 |
| 4.2 - Obtenção do RNA mensageiro codificando a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> | 46 |
| 4.3 - Avaliação da integridade dos RNAs mensageiros da proteína Hsp65 por RT- PCR | 46 |
| 4.4 - Avaliação <i>in vitro</i> da expressão da proteína Hsp65 por <i>Western blotting</i> | 47 |
| 4.5 - Obtenção das APCs..... | 48 |
| 4.6 - Marcação do RNA mensageiro (mRNA-Hsp65) e ensaios de eletroporação e viabilidade celular | 49 |
| 4.7- Avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras nas APCs: LBs, Mφs, CDs..... | 50 |
| 4.8 - Imunogenicidade..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 4.8.1 - Proliferação de células totais do baço de animais vacinados | 52 |
| 4.8.2 - Produção de citocinas por células totais do baço de animais vacinados | 53 |
| 4.8.3 - Produção de anticorpos anti-Hsp65 e anti-BCG | 54 |
| 4.9 - Profilaxia (1 dose) | 54 |
| 4.9.1- Produção de citocinas da cultura de células do pulmão..... | 55 |
| 4.9.2 - Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFCs)..... | 56 |
| 4.9.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar | 56 |
| 4.10 - Profilaxia (2 doses) | 57 |
| 4.10.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão | 58 |
| 4.10.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)..... | 59 |
| 4.10.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar | 59 |
| 4.11 - Terapia (1 dose)..... | 60 |
| 4.11.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão | 60 |
| 4.11.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)..... | 61 |
| 4.11.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar | 61 |
| 4.12 - Terapia (2 doses) | 62 |
| 4.12.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão | 62 |
| 4.12.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)..... | 63 |
| 4.12.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar | 63 |
| 4.13 - Profilaxia 2 doses (via subcutânea) | 64 |
| 4.13.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão | 64 |
| 4.13.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)..... | 65 |
| 4.13.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar | 65 |
| 4.14 - Terapia 2 doses (via subcutânea)..... | 66 |
| 4.14.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão | 66 |
| 4.14.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)..... | 67 |
| 4.14.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar | 67 |
| 5- DISCUSSÃO..... | 69 |
| 6- CONCLUSÕES..... | 88 |
| 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 90 |

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- **Ag85:** Antígeno 85 de *Mycobacterium tuberculosis*
- **AIDS:** *Acquired Immunodeficiency Syndrome* - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- **APC:** Célula apresentadora de antígeno
- **BALT:** Tecido linfóide associado aos brônquios
- **BCG:** Bacilo Calmette-Guérin
- **CD:** Célula dendrítica
- **CD:** Grupo de diferenciação
- **cDNA:** DNA Complementar
- **CFSE:** Carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster
- **CpG:** Dinucleotídeo citosina-guanina
- **ConA:** Concanavalina A
- **CTL:** Célula T citotóxica
- **DC-SIGN:** *Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin*
- **DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- **DO:** Densidade óptica
- **ELISA:** *Enzyme-linked immunosorbent assay* - ensaio imunoenzimático de adsorção
- **ESAT-6:** *6kDa Early Secreted Antigenic Target*
- **FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- **GM-CSF:** Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
- **HEK:** Célula de rim de embrião humana
- **Hsp65:** Proteína de choque térmico de 65 kDa de *Mycobacterium leprae*
- **Ig:** Imunoglobulina
- **IFN- γ :** Interferon gama
- **IL:** Interleucina
- **i.n:** Intranasal
- **i.v:** Intravenoso
- **KDa:** Kilodaltons
- **Kb:** Kilobases
- **LB:** Linfócito B

- **LPS**: Lipopolissacarídeo
- **manLAM**: Lipoarabinomanana manosilada
- **MDR**: Multi-droga resistente
- **MHC**: Complexo de histocompatibilidade principal
- **mRNA**: RNA mensageiro
- **Mtb**: *Mycobacterium tuberculosis*
- **MyD88**: Myeloid differentiation primary response gene 88
- **NK**: Células naturalmente citotóxicas
- **PBS**: Solução fosfato tamponada
- **PE**: Ficoeritrina
- **pcDNA3**: DNA plasmideal utilizado como vetor
- **pcDNA3A-Hsp65**: DNA plasmideal contendo a ORF da Hsp65 com 3'UTR
- **PCR**: Reação em cadeia da polimerase
- **PKR**: Proteína quinase R
- **RNA**: Ácido ribonucléico
- **RT**: Retrotranscrição reversa
- **SBF**: Soro bovino fetal
- **SDS**: Duodecil sulfato de sódio
- **SDS-PAGE**: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições dissociantes
- **TB**: Tuberculose
- **TGF- β** : Fator transformador de crescimento beta
- **Th**: Resposta imune de linfócito T "helper" (auxiliar)
- **TNF- α** : Fator de necrose tumoral alfa
- **TLR**: Receptor do tipo Toll
- **tRNA**: RNA transportador
- **UFC**: Unidade formadora de colônia
- **XDR**: Extremamente resistente a drogas

RESUMO

Resumo

ROCHA, C. D. **Avaliação de uma nova metodologia vacinal baseada no uso de RNA mensageiro na tuberculose experimental.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Com o intuito de avaliar uma nova metodologia vacinal baseada no uso do RNA mensageiro na tuberculose (TB) experimental esse projeto se propôs a investigar a imunogenicidade, a proteção e o efeito terapêutico gerado pela imunização de camundongos com linfócitos B (LBs), células dendríticas (CDs) ou macrófagos (Mφs) transfectados com mRNA-Hsp65 ou pulsados com a proteína recombinante Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. A avaliação da integridade do mRNA-Hsp65 e da ocorrência de tradução da proteína em células transfectadas foram confirmadas por RT-PCR e WB e nos permitiu comprovar a ocorrência do processo de tradução e concluir que este se trata de um evento rápido e de curta duração nas células transfectadas. A análise fenotípica das APCs submetidas aos diferentes estímulos: células não tratadas, estimuladas por contato com mRNA-Hsp65, eletroporadas com mRNA-Hsp65, somente eletroporadas (mock), ou pulsadas com proteína recombinante Hsp65; revela que de forma geral os Mφs e CDs quando estimulados apresentaram maior expressão de moléculas co-estimuladoras quando comparados aos LBs submetidos às mesmas condições, além de sugerirem fortemente que tanto o mRNA-Hsp65 quanto a proteína apresentam propriedades imuno-estimuladoras. Os ensaios de imunogenicidade mostraram que a capacidade proliferativa de células recuperadas dos animais vacinados e re-estimuladas *in vitro* com Hsp65 foi significativamente maior do que a observada nos animais imunizados com salina, nos grupos: LBs eletroporados com mRNA-Hsp65, CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65. Notamos que nos grupos imunizados com APCs ocorreu proliferação celular mesmo na ausência do re-estímulo *in vitro* com a proteína Hsp65. Acreditamos que isso possa ter ocorrido em virtude da capacidade das APCs de induzirem uma ativação de células T específicas contra proteínas do Soro Bovino Fetal (SBF). Ou seja, quando em cultura as APCs capturaram proteínas do meio apresentando-as em contexto de MHC e ativando, *in vivo*, linfócitos T específicos contra proteínas do soro. Quando houve re-estímulo *in vitro* as proteínas do soro agiram como antígenos e “mascararam” a ativação de linfócitos T específicos contra a Hsp65. Na dosagem de citocinas vimos que células provenientes do baço de animais imunizados com CDs mock ou CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 foram capazes de induzir um perfil misto de resposta com produção de IFN- γ mas também de IL-5 e IL-10. Por outro lado, as células recuperadas de LBs e Mφ eletroporados com mRNA-Hsp65 apenas produziram citocinas de perfil Th2. Nesses resultados de dosagem de citocinas de células re-estimuladas *in vitro* também não pode ser descartado o efeito induzido pelo SBF. A dosagem de anticorpos revelou que nenhuma das imunizações com APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 foi capaz de induzir uma resposta humoral específica. A avaliação da capacidade profilática e terapêutica da transferência de uma ou duas doses das diferentes formulações de APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65 não revelou alterações significativas nos níveis de citocinas no pulmão, não foi capaz de reduzir a carga bacilar no pulmão dos animais infectados e não

preservou o tecido pulmonar. Quando optamos pela administração de 2 doses de Mφs ou CDs pulsadas com mRNA-Hsp65 ou com a proteína Hsp65 administradas por via subcutânea também não obtivemos redução do número de bactérias no pulmão. A partir desses dados concluímos que esse novo modelo vacinal baseado no uso de mRNA ou da proteína Hsp65 carregadas por APCs é incapaz de gerar efeito profilático e/ou terapêutico na tuberculose experimental.

Palavras-chave: APCs, mRNA-Hsp65, vacinação, Tuberculose

ABSTRACT

Abstract

ROCHA, C.D. **Evaluation of a new vaccine approach using messenger RNA in experimental tuberculosis.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Here we investigated a new RNA-based vaccine approach during experimental tuberculosis. Both prophylactic and therapeutic effects induced by APCs pulsed with Hsp65 protein or transfected with Hsp65mRNA of *Mycobacterium leprae* were evaluated in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Initially we checked the integrity of the Hsp65 mRNA and protein translation by RT-PCR and WB, respectively, and conclude that protein expression is an extremely short event in transfected cells. The phenotypic analysis of APCs subjected to different stimuli: transfected by passive pulsing with Hsp65 mRNA, only electroporated, electroporated with Hsp65 mRNA or pulsed with Hsp65 protein - revealed that DCs and M ϕ s submitted to these treatments showed an up regulation of co-stimulatory molecules, suggesting that both the Hsp65 mRNA and Hsp65 protein present immunostimulatory properties. The immunogenicity assays assessed to evaluate immune response in immunized mice revealed that cells recovered from mice vaccinated with Hsp65mRNA-transfected LBs and Hsp65mRNA-transfected DCs proliferated vigorously in vitro. We noted that this proliferation occurred even in the absence of re-stimulation in vitro with Hsp65 protein. We hypothesized that the exposure of APCs to foreign proteins contained in FBS during their generation in vitro, combined with the fact that the T cell proliferation assay was conducted in the presence of FCS, might explain this phenomenon by APC not re-stimulated with Hsp65 antigen in vitro. The antibody detection in serum of immunized mice revealed that none experimental approach with transfected APCs with Hsp65 mRNA was able to induce a specific humoral response. Cytokine measurements showed that spleen cells recovered from animals immunized with mock CDs or Hsp65mRNA-transfected DCs were able to induce a mixed Th1/Th2 response with production of IFN- γ but also IL-5 and IL-10. On the other hand, cells recovered from mice immunized with Hsp65mRNA-transfected LBs and Hsp65mRNA-transfected M ϕ s only induced Th2 profile. The evaluation of the prophylactic and therapeutic ability of the different formulations of APCs electroporated with mRNA with Hsp65 or pulsed with Hsp65 protein showed no significant changes in the lung cytokines levels, was not able to reduce the bacillary load and could not preserved lung parenchyma in infected animals. Changes in the number of doses, routes of administration as well as alteration in the method of transfection were unable to induce improvement in vaccine formulations. We conclude that this new vaccine approach using Hsp65 mRNA or protein carried by APCs are unable to generate prophylactic effect and/or therapeutic in experimental tuberculosis.

Keywords: APCs, Hsp65mRNA, vaccination, Tuberculosis

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Tuberculose e Vacinas de DNA

Atualmente estima-se que um terço da população mundial esteja infectado com *Mycobacterium tuberculosis*, resultando em aproximadamente três milhões de mortes por ano, o que representa uma das maiores causas de mortalidade no mundo (Skeiky and Sadoff 2006). Noventa por cento das pessoas infectadas desenvolvem uma forma latente e assintomática e uma pequena parcela (cerca de 10%) pode apresentar reativação da infecção em algum momento da vida. Por outro lado, 5 a 10% das pessoas infectadas desenvolvem a doença progressiva (Flynn and Chan 2005). Além disso, a tuberculose (TB) é a principal causa de morte em pacientes HIV positivos. Apesar de haver tratamento efetivo contra a TB, este é bastante longo, cerca de 6 meses pelo menos, o que leva a altos índices de abandono e favorece o surgimento de cepas multi-droga resistentes (MDR) e também cepas extremamente resistentes (XDR) (Chan and Iseman 2008). Até o presente momento, a única vacina utilizada contra a TB é o BCG - Bacillus Calmette-Guérin - uma vacina baseada na imunização com *Mycobacterium bovis* vivo atenuado, introduzida para uso em humanos em 1921. Embora a vacinação com BCG confira proteção contra a forma disseminada da doença em recém-nascidos e crianças, estudos realizados em diferentes populações têm demonstrado que esta vacina não proporciona uma proteção consistente contra a tuberculose pulmonar adulta (proteção variável de 0% a 80%) (Fine and Vynnycky 1998). A causa dessa variação na eficácia do BCG ainda não foi completamente elucidada, entretanto algumas hipóteses têm sido levantadas como: pré-exposição à micobactérias ambientais, diferenças entre as várias cepas

de BCG, modificações fenotípicas durante o processo de atenuação, perda de antígenos imunogênicos, incapacidade de estimular eficientemente a resposta de linfócitos T CD4 e CD8, variações nas doses e rotas de administração e também o próprio processo de liofilização da vacina (Fine 1998; Brewer, Heymann et al. 2001).

A baixa eficácia do BCG tem levado a inúmeras pesquisas para o desenvolvimento de uma nova vacina. Existem basicamente duas estratégias de vacinação contra a TB: aquela que é administrada antes da exposição (profilática) e a que é administrada depois da exposição (terapêutica). Entre essas novas estratégias vacinais encontram-se: *Mycobacterium tuberculosis* atenuado, BCG recombinante, vacinas de subunidade, vacinas utilizando vetores virais não replicativos e vacinas de DNA (Haile and Kallenius 2005; Skeiky and Sadoff 2006; Gupta, Katoch et al. 2007; Reece and Kaufmann 2008).

Progressos têm sido observados com vacinas de DNA plasmideal como sistema de carreamento de antígenos de *M. tuberculosis*, dentre os quais se destacam as proteínas secretadas como ESAT-6 e Ag85 (Kamath, Feng et al. 1999; Tanghe, D'Souza et al. 2001; Minion, Menon et al. 2003; Pan, Cai et al. 2003; Cai, Tian et al. 2004) e a proteína de choque térmico de 65KDa (Hsp65) (Bonato, Lima et al. 1998; Wang, Bai et al. 2008; Changhong, Hai et al. 2009). A grande vantagem da utilização de vacinas baseadas em DNA plasmideal, contendo genes de proteínas imunogênicas, é que estas fornecem as informações genéticas necessárias para que o próprio organismo sintetize o antígeno, sem os efeitos indesejáveis da introdução de um agente infeccioso (Smith, Goldenthal et al. 1997). As vacinas plasmidiais apresentam ainda como vantagens: (i) são aparentemente capazes de induzir tanto a resposta imune celular (linfócitos CD4 e CD8) como a humoral se utilizadas corretamente, isto é, com a dose, frequência e via de administração apropriadas; (ii)

do ponto de vista prático, elas oferecem a possibilidade de combinar antígenos de um mesmo ou de diferentes patógenos ou mesmo a co-administração com imunomoduladores; (iii) carregam em si a função adjuvante mediada pelos motivos CpG do DNA; e (iv) são de fácil produção, armazenamento e apresentam uma boa estabilidade (Shedlock and Weiner 2000).

Estudos desenvolvidos no Núcleo de Pesquisa em Tuberculose da FMRP-USP têm confirmado que a vacinação com DNA plasmideal é efetiva, ou seja, resultados experimentais demonstraram que a vacinação com DNA plasmideal pcDNA3 codificando a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* (pcDNA3-Hsp65) é capaz de proteger camundongos Balb/c contra subsequente desafio com a linhagem virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* (Lowrie, Tascon et al. 1994; Tascon, Colston et al. 1996). Esta proteção foi atribuída principalmente à presença de linfócitos T CD8 antígeno-específicos com atividade citotóxica, produtores de IFN- γ , com alta expressão de CD44 (um marcador fenotípico de memória) e um perfil característico de resposta imune do tipo Th1 (Bonato, Lima et al. 1998; Silva and Lowrie 2000). Além disso, estudos adicionais utilizando camundongos infectados com *M. tuberculosis* e posteriormente tratados com a vacina pcDNA3-Hsp65, demonstraram um declínio significativo no número de bactérias no pulmão e no baço, com predomínio de uma resposta imune de padrão Th1. Desta forma, a vacinação com pcDNA3-Hsp65 também se mostrou efetiva quando utilizada como terapia contra a TB (Lowrie, Tascon et al. 1999).

Apesar do sucesso das vacinas de DNA em modelos experimentais utilizando roedores, esta estratégia de vacinação não parece ser tão eficiente quando aplicada em primatas e também em humanos, possivelmente devido à quantidade elevada de DNA necessária para gerar proteção (1mg/dose) (Ulmer 2001). Nesse sentido,

estudos sobre o tráfego intracelular do DNA plasmideal desenvolvidos no Núcleo de Pesquisa em Tuberculose da FMRP-USP demonstram as dificuldades enfrentadas pelo DNA procariótico dentro da célula eucariótica (captura, tráfego endossomo / lisossomo - núcleo), justificando assim a necessidade de altas doses, que em humanos podem chegar a miligramas (Trombone, Silva et al. 2007). Mesmo utilizando-se sistemas de liberação, tais como microesferas de PLGA [Poli (D,L-lático-co-glicólico)] com o intuito de proteger o DNA da degradação de nucleases e, conseqüentemente, diminuir a dose administrada, a liberação do DNA plasmideal para o citosol e a eficiência deste em atingir o núcleo continuam sendo um obstáculo para este tipo de vacinação (Lima, Santos et al. 2003).

1.2 - Vacinas de DNA, Resposta imune e APCs

Até o momento, pouco se conhece sobre os mecanismos que envolvem o caminho percorrido pelo DNA plasmideal até a geração de uma resposta imune protetora. Muitas barreiras devem ser transpostas para que haja uma completa eficiência da transferência do gene para célula hospedeira, entre as quais se podem citar a membrana endossômica e o envelope nuclear. Do mesmo modo, os eventos que envolvem a apresentação do antígeno para sub-populações de linfócitos T também não estão totalmente elucidados. Outro aspecto pouco conhecido, mas não menos importante, envolve a biodistribuição do DNA plasmideal e as células envolvidas na captura desse DNA *in vivo*. O entendimento desses mecanismos poderá otimizar o uso das vacinas de DNA e favorecer o desenvolvimento de novos vetores e/ou estratégias em vacinação e terapia gênicas. Estudos realizados no Núcleo de Pesquisa em Tuberculose usando a vacina de DNA contra a tuberculose

como modelo revelam que a imunização com 100 µg do pcDNA3-Hsp65, injetados por via intramuscular, levam a uma ampla distribuição tecidual do plasmídeo, podendo este ser recuperado de vários tecidos como, por exemplo, baço, linfonodo, fígado, pulmão, medula óssea, rim, timo e músculos. Baseados no padrão de metilação, os dados mostram que o plasmídeo não se replica *in vivo*. Além disso, a expressão da Hsp65 é transiente, estando presente em quase todos os tecidos analisados até o sétimo dia após a injeção, passando a ser detectada apenas no músculo e fígado no décimo quinto dia após a injeção e não sendo mais detectada a partir de um mês (Coelho-Castelo, Trombone et al. 2006; Trombone, Silva et al. 2007). Outros resultados mostram também que, após a imunização intramuscular, o pcDNA3-Hsp65 pode ser detectado em células CD11b+, CD11c+ (células dendríticas) e linfócitos B, tanto do linfonodo como da medula óssea. Esse fato sugere que células B possam participar da indução da resposta imune, no modelo de vacinas de DNA (Coelho-Castelo, Santos Junior et al. 2003).

Alguns autores propõem que a indução da resposta imune pelas vacinas de DNA possa ter início após a transfecção de uma célula somática, não apresentadora de antígeno profissional, enquanto outros autores têm demonstrado a importância de células dendríticas da medula óssea na indução dessa resposta (Gurunathan, Klinman et al. 2000). Embora a importância das células apresentadoras de antígenos (APCs) - como as células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos - fique clara na maioria dos modelos testados, não existe um consenso sobre a necessidade dessas células serem diretamente transfectadas ou capturarem o antígeno sintetizado em outras células, para dar início à resposta imune (Torres, Iwasaki et al. 1997; Akbari, Panjwani et al. 1999; Abdulhaqq and Weiner 2008). Após a captura do DNA plasmidial por uma APC, o antígeno produzido endogenamente entra na rota de

degradação endógena, sendo apresentado na superfície celular no contexto de moléculas de MHC de classe I, levando a ativação de linfócitos CD8 específicos. Por outro lado, parte dos antígenos produzidos endogenamente, quando secretados e/ou liberados da célula após a morte celular, poderia ativar tanto células CD4 quanto CD8, nesse último caso através do *cross-priming* (Shedlock and Weiner 2000; Abdulhaqq and Weiner 2008). Os linfócitos B também podem capturar antígenos liberados levando à produção de anticorpos específicos (Gurunathan, Klinman et al. 2000). No entanto, a apresentação antigênica após a injeção de DNA plasmideal parece ser mais complexa do que o habitual. Askew *et al.* (Askew, Chu et al. 2000) demonstraram que os motivos de CpG, além de induzir a maturação de células dendríticas, foram capazes de induzir um aumento transiente na apresentação de alguns peptídeos por moléculas de MHC de classe II. Tal efeito sugere que a própria molécula de DNA possa interferir com a apresentação antigênica durante a indução da resposta imune. O entendimento dos mecanismos envolvidos no processamento antigênico em vacinas de DNA pode favorecer o desenvolvimento de vetores e de estratégias que visem o aumento do processamento e da apresentação antigênica.

A observação feita por estudos realizados no Núcleo de Pesquisa em Tuberculose, de que, após a imunização intramuscular, o DNA plasmideal pode ser capturado *in vivo* por linfócitos B da medula óssea e do linfonodo drenante (Coelho-Castelo, Santos Junior et al. 2003), abrem novas perspectivas no entendimento da participação de diferentes tipos celulares na ativação da resposta imune mediada por vacinas de DNA. Células B podem agir como APCs, além de produzirem citocinas que modulem a resposta de linfócitos T CD4 e CD8, contribuindo para a geração de memória.

O papel de células B na modulação da resposta de células T tem sido estudado em diferentes modelos experimentais e parece diferir de acordo com o estímulo antigênico e com o agente infeccioso. Linfócitos B podem capturar, processar e apresentar antígenos solúveis podendo participar (Liu, Wu et al. 1995; Constant 1999; Linton, Harbertson et al. 2000) ou não (Ronchese and Hausmann 1993; Topham, Tripp et al. 1996; van Essen, Dullforce et al. 2000) da indução da resposta de linfócitos CD4.

A participação de linfócitos B como APC foi demonstrada em diferentes sistemas experimentais (Pierce, Morris et al. 1988). Também já se demonstrou a participação das células B como apresentadoras de antígeno aumentando a proliferação e a expansão de linfócitos T CD4 (Kleindienst and Brocker 2005). Além disso, células B CD40 ativadas quando transfectadas com um vetor viral induzem linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos (Kondo, Topp et al. 2002) e células B ativadas por ligante de CD40 são capazes de ativar células T virgens e induzir produção de linfócitos T de memória (von Bergwelt-Baildon, Vonderheide et al. 2002), reafirmando a importância dessas células na apresentação antigênica em modelos vacinais. No entanto, a participação de células B na indução da resposta imune em vacinas gênicas é muito pouco explorada. A importância do linfócito B tem sido ressaltada no modelo de imunização intra-esplênica, usando-se vetores que apresentam promotores de imunoglobulinas que visam à expressão seletiva do antígeno em linfócitos B (Langlade-Demoyen, Garcia-Pons et al. 2003). A imunização de animais deficientes de células dendríticas com linfócitos B transgênicos induz a ativação de células T e a geração de memória, mostrando uma eficiente participação de células B como APC (Gerloni, Rizzi et al. 2004; Zanetti, Castiglioni et al. 2004).

O papel das células B durante a infecção com *Mycobacterium tuberculosis* ainda é controverso. Alguns relatos sugerem que as células B apresentem pouca contribuição no controle ou exacerbação da fase crônica da infecção experimental. (Vordermeier, Venkataprasad et al. 1996; Johnson, Cooper et al. 1997). Por outro lado, Bosio et al mostraram que animais deficientes de células B apresentam um atraso na disseminação e na formação de lesões granulomatosas (Bosio, Gardner et al. 2000). A descrição mais recente da formação de folículos ectópicos com presença de linfócitos B (LBs) apresentando marcadores de centro germinativo (CG) aliada a evidências de ação moduladora na formação do granuloma e de melhora da resposta imune local na infecção por *M. tuberculosis* apontam para um papel mais evidente dos LBs na TB (Maglione, Xu et al. 2007; Maglione and Chan 2009). Além disso, estudo realizado por nosso grupo utilizando animais deficientes de células B (Previato et al - manuscrito em elaboração), mostra a importância destas como apresentadoras de antígenos e na proteção contra a TB experimental utilizando como modelo a vacina DNA-Hsp65.

As células dendríticas (CDs) são consideradas como as principais células envolvidas na ativação de linfócitos T virgens e, conseqüentemente, na indução de uma resposta imune celular mediada por células. Isso em parte é decorrente de duas de suas principais propriedades que são a eficiência de endocitose e de apresentação antigênica, sendo capazes de capturar e apresentar antígenos mesmo quando em concentrações extremamente baixas (Watts and Amigorena 2000). A captura de antígeno é particularmente eficiente em células dendríticas devido ao nível elevado de macropinocitose que essas células apresentam, podendo capturar uma área correspondente ao seu próprio volume em uma hora (Sallusto, Cella et al. 1995; Norbury, Chambers et al. 1997).

A capacidade de apresentação de antígenos em CDs é modificada durante seu processo de desenvolvimento. Enquanto células imaturas apresentam uma alta capacidade endocítica, e ineficiência do ponto de vista de apresentação antigênica, as células maduras praticamente não realizam endocitose, mas são excelentes apresentadoras de antígeno. Assim, a eficiência na apresentação de antígeno pelas CDs está relacionada a sua alta capacidade de capturar antígenos quando imatura, em sítios periféricos, e a sua alta capacidade de apresentar antígenos em órgãos linfóides, quando madura, devido a um aumento de expressão, em sua superfície, de moléculas de MHC e moléculas co-estimuladoras durante o processo de maturação (Cella, Engering et al. 1997). Estudo realizado mais recentemente revela que CDs maduras não são capazes de apresentar novos antígenos via MHC-II e que isso ocorre principalmente por uma regulação negativa da expressão de MHC-II, ao contrário de uma redução dos processos de captura e processamento de antígenos (Young, Wilson et al. 2007).

O fato de as CDs serem APCs profissionais extremamente eficientes e sua indiscutível capacidade de ativar de linfócitos T *naive* as tornam elementos chaves na indução de uma resposta imune protetora em modelos de vacinas de DNA. A transfecção direta de uma CD, a captura de antígenos secretados por células somáticas transfectadas ou o englobamento de corpos apoptóticos provenientes de células transfectadas (*cross-priming*) garantem a apresentação de antígenos codificados pelo DNA plasmideal no contexto de moléculas de MHC de classe I e II levando conseqüentemente a ativação de uma resposta tanto CD8 quanto CD4 (Shedlock and Weiner 2000).

A excelente habilidade de apresentar antígenos e ativar linfócitos tem despertado o interesse pela utilização direta de CDs em modelos vacinais ou

terapêuticos contra doenças infecciosas (Encke, Findelee et al. 2005; Yu, Huang et al. 2006; Remer, Apetrei et al. 2007) e tumores (Kim, Choo et al. 2006; Cho, Kim et al. 2007). Nesses modelos fica evidente a capacidade de indução de uma resposta celular mediada pela ativação de células T antígeno-específicas. Diversos trabalhos evidenciam o sucesso da imunização com CDs na indução de uma resposta imune protetora em ensaios *in vivo* em camundongos (Aline, Brand et al. 2007; Carrion, Nieto et al. 2007) e até alguns ensaios clínicos em humanos (Lu, Arraes et al. 2004; Connolly, Whiteside et al. 2008).

O papel das CDs durante a infecção por *M. tuberculosis* tem sido bastante estudado. A grande maioria dos bacilos entra nas CDs via interação DC-SIGN e seu ligante na micobactéria, o lipoarabinomanam (ManLAM). Ao contrário dos macrófagos que permitem o crescimento do bacilo, as CDs impedem tal fenômeno. A persistência da micobactéria no interior das CDs parece estar associada com sua localização em vacúolos que restringem o acesso às vias de reciclagem e de biossíntese da célula, e, portanto priva o patógeno de nutrientes essenciais para seu crescimento, mas sem levar a sua eliminação (Tailleux, Neyrolles et al. 2003). As CDs infectadas não perdem a capacidade de ativar linfócitos T e podem migrar para os órgãos linfóides secundários. Esse fenômeno permite que a infecção se espalhe para os linfonodos locais levando a uma persistência do patógeno e uma estimulação crônica do sistema imune (Herrmann and Lagrange 2005).

No caso específico da infecção pelo *M. tuberculosis* alguns estudos revelam que o uso de CDs pulsadas com proteínas micobacterianas pode induzir uma imunidade protetora contra a TB. A imunização de camundongos com CDs pulsadas com peptídeos específicos para CD8 já se mostrou capaz de reduzir a carga bacilar no pulmão de animais infectados (Dow, Roberts et al. 2000; Doi, Yamada et al.

2007). Em outro modelo Mcshane et al demonstram que para haver proteção contra a TB, CDs necessitam ser pulsadas ao mesmo tempo com peptídeos tanto para CD4 como para CD8 (McShane, Behboudi et al. 2002). Nesses modelos é evidenciada a necessidade de ativação de linfócitos T CD8 para haver proteção. Outro estudo também demonstra que CDs pulsadas com um complexo de proteínas micobacterianas levam à redução da carga bacilar, melhora da patologia do pulmão e ao aumento na sobrevivência dos animais vacinados e infectados com *M. tuberculosis* (Rubakova, Petrovskaya et al. 2007).

Os macrófagos (M ϕ s) assim como as CDs são APCs derivadas da medula óssea e como estas estão envolvidos com a apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T. Nos modelos de vacina de DNA já foi demonstrado a capacidade dessas células em processar e apresentar antígenos e possuir moléculas co-estimuladoras participando assim na ativação de linfócitos T *naive* e na indução de uma resposta imune protetora (Chattergoon, Robinson et al. 1998). Mais recentemente, também foi descrita a capacidade de M ϕ s ativarem diretamente linfócitos T CD8 levando-os a adquirir uma função efetora e também gerando células de memória (Pozzi, Maciaszek et al. 2005).

Assim como as CDs, M ϕ s pulsados com proteína são capazes de induzir uma resposta imune protetora em alguns modelos de vacinação. Segundo Gustavson et al a imunização de camundongos com macrófagos pulsados com proteínas específicas é capaz de controlar a inflamação granulomatosa na infecção por *Schistosoma mansoni* (Gustavson, Zouain et al. 2002). Outro estudo demonstra o efeito antitumoral em animais imunizados com M ϕ s fusionados com células cancerosas (Suzuki, Fukuhara et al. 2005).

O papel dos Mφs na infecção por *M. tuberculosis* já está bem caracterizado. Essa APC profissional faz parte da primeira linha de defesa contra a invasão pelas micobactérias e as engloba em fagossomas. A fusão do fagossoma com lisossoma resulta na destruição do patógeno (Nguyen and Pieters 2005). Entretanto, para escapar desse mecanismo da defesa inata, o *M. tuberculosis* desenvolveu algumas estratégias, como por exemplo o impedimento da fusão do fagossomo com lisossoma. O *M. tuberculosis* também leva a uma diminuição da expressão de MHC de classe II pelos macrófagos infectados, impede do processamento de antígeno, reduz a resposta ao IFN- γ e diminui a produção de citocinas e de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio (Hestvik, Hmama et al. 2005).

1.3 - Vacinas de RNA

Apesar do sucesso das vacinas de DNA em vários modelos experimentais de vacinação e terapia, algumas questões ainda são levantadas em relação à segurança do DNA plasmideal, dentre elas, a possibilidade de integração com o genoma do hospedeiro, podendo assim interferir na ativação de oncogenes ou na inativação de genes supressores de tumor (Klinman, Takeno et al. 1997; Liu and Ulmer 2005; Bodles-Brakhop and Draghia-Akli 2008); ou ainda, com a capacidade das moléculas de DNA persistirem por longo tempo no núcleo, o que poderia gerar grandes quantidades da proteína transgênica podendo assim, resultar 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 auto-imunes como, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide. Por outro lado, estudos realizados no Núcleo de Pesquisa em

Tuberculose FMRP-USP demonstraram que a vacinação com DNA-Hsp65 induziu modulação e proteção em modelo animal de artrite (Santos-Junior, Sartori et al. 2005).

Devido aos possíveis riscos associados à vacinação com DNA plasmideal atualmente tem se utilizado, como alternativa, o RNA mensageiro (mRNA) de determinado antígeno e, neste caso, esses riscos não seriam relevantes. Com a administração do mRNA o processo de tradução realizado pelas células hospedeiras constitui a primeira etapa, diferente da vacina de DNA, na qual o DNA precisa vencer a barreira da membrana nuclear para ser primeiramente transcrito e depois traduzido em proteína no citosol. Isso leva à diminuição da dose de mRNA a ser usada, quando comparada às doses de DNA plasmidiais, o que refletiria diretamente no aspecto de biossegurança de vacinas gênicas. Outra vantagem das vacinas de mRNA reside no fato das mesmas já serem traduzidas no citosol, evitando a entrada no núcleo celular e diminuindo muito as chances de integração ao genoma.

Na vacinação com mRNA, a partir da síntese protéica, os passos seguintes são os mesmos já conhecidos para as vacinas de DNA, ou seja, os antígenos expressos endogenamente são degradados em peptídeos pelo proteassoma e, em seguida, transportados para o retículo endoplasmático, onde são associados a moléculas de MHC de classe I. A apresentação do complexo (peptídeo-MHC de classe I) na superfície das APCs poderá ativar os linfócitos T CD8 (Rock, York et al. 2002). Por outro lado, parte dos antígenos produzidos pelas células hospedeiras é secretada para o meio exterior das mesmas, sem sofrerem processamento, onde poderão tanto estimular linfócitos B a produzirem anticorpos específicos, como serem endocitados por outras APCs e estimularem linfócitos T CD4 (Bryant, Lennon-Dumenil et al. 2002). Desta forma, a vacinação com mRNA, semelhante a de DNA,

poderá estimular linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e linfócitos T auxiliares (Pascolo 2004).

A utilização do RNA como estratégia terapêutica começou com a descoberta de que RNA de dupla fita possuía propriedades imuno-estimuladoras (Absher and Stinebring 1969). Posteriormente, demonstrou-se que o RNA de dupla fita era capaz de bloquear o crescimento de tumores transplantados em camundongos (Pimm, Embleton et al. 1976; Carter, Strayer et al. 1985). Além disso, resultados promissores foram observados quando o RNA de dupla fita foi administrado intravenosamente em paciente HIV positivos (Carter, Strayer et al. 1987) ou com câncer (Brodsky, Strayer et al. 1985). Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que o RNA de fita simples é capaz de estimular o sistema imune via receptores do tipo Toll 7 (*Toll-like receptor* - TLR7) em camundongo e TLR8 em humanos (Diebold, Kaisho et al. 2004; Heil, Hemmi et al. 2004). Paralelamente, estudos adicionais demonstraram o potencial imuno-estimulador do RNA dupla fita via TLR3 (Alexopoulou, Holt et al. 2001) e PKR -receptor de proteína quinase - (Ceppi, Ruggli et al. 2005).

Diante da possibilidade do RNA de ativar a resposta imune inata via receptores tipo Toll, além da capacidade de ativação de linfócitos T e B, várias vacinas baseadas em RNA têm sido desenvolvidas. Cerca de cinco métodos de vacinação utilizando mRNA já foram descritos: administração direta do mRNA nu (Wolff, Malone et al. 1990; Hoerr, Obst et al. 2000), mRNA replicativo (Cheng, Hung et al. 2001; Kofler, Aberle et al. 2004), mRNA encapsulado em lipossomas (Martinon, Krishnan et al. 1993; Zhou, Hoon et al. 1999), mRNA adsorvido em partículas de ouro (gene gun) (Qiu, Ziegelhoffer et al. 1996) e transfecção *in vitro* de APCs com mRNA (Boczkowski, Nair et al. 1996; Nair, Boczkowski et al. 2003). O primeiro relato do uso do mRNA nu *in vivo* foi de Wolff et al, no qual foi observado a expressão de

proteínas após a administração intramuscular do mRNA codificando luciferase ou beta-galactosidase (Wolff, Malone et al. 1990). Estudos posteriores confirmaram que a administração direta do mRNA é capaz de induzir resposta imune celular e humoral específica (Granstein, Ding et al. 2000; Hoerr, Obst et al. 2000). Além disso, já foi demonstrado que a injeção intradérmica do mRNA, é capaz de gerar uma resposta imune do tipo Th2, e que este padrão de resposta pode ser direcionado para Th1 quando GM-CFS é utilizado como adjuvante (Carralot, Probst et al. 2004).

Entre todas as estratégias citadas acima para vacinação com mRNA, a transferência de APCs (geralmente células dendríticas) transfectadas *in vitro* com mRNA, tem se destacado, principalmente pela sua eficácia na imunoterapia antitumoral, e neste caso, por ser a única testada em humanos - ensaios clínicos de fase I e II - (Weide, Garbe et al. 2008). Vacinas antitumorais baseadas em CDs, originalmente utilizavam proteínas, peptídeos ou lisados de células tumorais (Porgador and Gilboa 1995; Paglia, Chiodoni et al. 1996; Porgador, Snyder et al. 1996). Um estudo demonstrou que CDs pulsadas com mRNA codificando ovalbumina (OVA) de galinha eram capazes de ativar linfócitos T citotóxicos específicos para OVA. Além disso, a resposta citotóxica gerada pelas CDs pulsadas com mRNA foi mais efetiva do que a resposta produzida por CDs pulsadas com peptídeos da OVA, provavelmente pelo fato de que as células transfectadas com mRNA serem fontes mais duradouras de antígenos (Nair, Boczkowski et al. 2003). Cabe ressaltar, que este método tem sido aplicado com sucesso para induzir imunidade contra diferentes tipos de tumores (Jarnjak-Jankovic, Pettersen et al. 2005; Kyte, Kvalheim et al. 2005; Zhang, Zhang et al. 2006; Ni, Richmond et al. 2008), mas também contra fungos (Bacci, Montagnoli et al. 2002) e vírus (Weissman, Ni et al. 2000; Su, Peluso et al. 2001; Osman, Narita et al. 2003; Yu, Babiuk et al.

2008). Mais recentemente também se observou a capacidade de células B CD40 ativadas transfectadas com mRNA de induzir respostas de células T contra antígenos virais e tumorais (Coughlin, Vance et al. 2004; Van den Bosch, Ponsaerts et al. 2005).

Com o aumento do interesse pelas vacinas baseadas em mRNA, já que esta abordagem é considerada segura e eficiente, espera-se que mais ensaios clínicos em humanos sejam realizados. Entretanto, sabendo-se que estes ensaios requerem grandes quantidades de mRNA, a produção poderia ser considerada um obstáculo. Porém, atualmente este fato não é considerado um empecilho, uma vez que a produção dos mRNAs é considerada relativamente fácil, com rendimentos satisfatórios e facilmente preparado sob condições GMP (*Good Manufacturing Practice*) (Pascolo 2004).

Tratando-se particularmente da TB, já foi descrito o uso da molécula de mRNA nua codificando o antígeno MTP83 como estratégia vacinal (Xue, Stavropoulos et al. 2004). Estudo realizado recentemente no Núcleo de Pesquisa em Tuberculose também avalia as propriedades profiláticas do mRNA que codifica a proteína Hsp65 de *M. leprae* (mRNA-Hsp65) em animais infectados com *M. tuberculosis*. Os resultados obtidos revelam que embora os efeitos tenham sido modestos, a vacina mRNA-Hsp65 - administração da molécula de mRNA nua, por via intranasal - foi capaz de reduzir a carga bacilar no pulmão dos animais infectados (dissertação de Mestrado, Lorenzi, J.C.C. 2007).

Diante do exposto, nos propomos, neste projeto, a avaliar uma nova metodologia vacinal baseada no uso do RNA mensageiro na tuberculose experimental. A imunogenicidade bem como os efeitos profiláticos e terapêuticos gerados pela imunização de camundongos com células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, transfectados *in vitro* com o RNA mensageiro que codifica para a proteína Hsp65 de *M. leprae* ou pulsados com a proteína recombinante Hsp65, em animais infectados com o *M. tuberculosis* serão investigados.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - Geral

- Avaliar o potencial profilático e terapêutico de uma nova abordagem vacinal baseada no uso de APCs transfectadas com moléculas de mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65, no modelo da tuberculose.

2.2 - Específicos

- Analisar a integridade e a funcionalidade da molécula de mRNA-Hsp65 gerada *in vitro* a partir do plasmídeo pcDNA3A-Hsp65, através da detecção da proteína;

- Avaliar a eficiência do processo de eletroporação para transfecção de APCs com mRNA-Hsp65 ;

- Avaliar a viabilidade das APCs submetidas ao processo de eletroporação;

- Analisar o perfil fenotípico das APCs eletroporadas ou pulsadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65;

- Avaliar a imunogenicidade gerada após a imunização de camundongos Balb/c por via intravenosa, com linfócitos B, macrófagos, CDs e transfectados com mRNA-Hsp65 através da análise da produção de anticorpos específicos e citocinas;

- Determinar o grau de proteção gerado pela vacinação com APCs eletroporadas ou pulsadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65, por via intravenosa ou subcutânea, contra a tuberculose experimental, através da produção de citocinas, contagem do número de unidades formadoras de colônia no pulmão e análise histológica e morfométrica do tecido pulmonar dos animais desafiados;
- Avaliar os efeitos terapêuticos contra tuberculose experimental em animais infectados com *M. tuberculosis* e tratados com as APCs eletroporadas ou pulsadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65, pela via intravenosa ou subcutânea, por meio da análise da produção de citocinas, do número de unidades formadoras de colônia e da histologia e morfométrica dos pulmões.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Obtenção dos plasmídeos recombinantes pcDNA3A-Hsp65 e pcDNA3

Os plasmídeos pcDNA3A-Hsp65 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 bactérias *Escherichia coli* DH5α™ transformada com o plasmídeo recombinante pcDNA3A-Hsp65 ou pcDNA3 foi retirada de uma placa recém preparada contendo meio LB (Luria-Bertaini) Agar (SIGMA, Germany) e ampicilina (Cilidon™) na concentração de 100 µg/ml. Esta colônia foi inoculada em 5,0 ml de caldo LB BROTH BASE (GIBCO BRL, Scotland) com ampicilina (100 µg/ml) e incubada durante 8 horas a 37°C sob agitação vigorosa (250 rpm) em incubadora com agitação (Incubador shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A cultura inicial 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 incubação o material foi centrifugado a 4.000g por 15 minutos a 4°C e o sedimento ressuspenso 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 200mM; SDS 1%) e após 5 minutos adicionou-se 125 ml do tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH5,5). 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 750mM, MOPS 50mM pH7,0; 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 plasmídeo foi eluído com 30 ml de tampão QF (NaCl 1,25M, MOPS 50mM pH7,0, etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado em 52,5 ml de isopropanol e em seguida centrifugado a 1.500g por 45 minutos a 4°C e o sedimento ressuspensão em 0,5 - 1,0 ml de água.

3.2 - Quantificação dos plasmídeos purificados

A quantificação dos plasmídeos pcDNA3A-Hsp65 e pcDNA3 foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm utilizando o aparelho Gene Quant II™ (Pharmacia Biotech, Cambridge - England). Cabe ressaltar que todos os plasmídeos foram submetidos ao teste cromogênico do lisado de amebócito de *Limulus polyphemus* (Kit QCL – 1000 – Quantitative Chromogenie – Bio Whittaker – CAMBREX Company) para avaliação do nível de endotoxina.

3.3 - Avaliação da integridade dos plasmídeos

A presença do inserto da Hsp65 no plasmídeo pcDNA3A-Hsp65 foi verificada utilizando as enzimas de restrição de restrição *Apa* I e *Bam*H I (Invitrogen, Life Technologies®). Um micrograma do plasmídeo foi incubado com *Bam*H I (1U/μg de DNA) a 37°C por 3 horas e posteriormente com *Apa* I 32°C por 3 horas (1U/μg de DNA). Para o vetor pcDNA3 utilizou-se apenas a enzima de restrição *Bam*H I. Em seguida os produtos da digestão de cada amostra, e também os plasmídeos não digeridos, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich, Germany) a 1%. As amostras foram ressuspensas em tampão de eletroforese 6 vezes concentrado (0,25% azul de bromofenol; 40% de sucrose em água) e o

material submetido a eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM pH8,3). A corrida foi realizada a 76V por 1 hora utilizando o aparelho da Life Technologies Inc., Modelo 250 (BRL). O padrão de 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, life technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado com 0,5µg/ml de brometo de etídio (Gibco BRL) e a visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

3.4 - Confeção dos iniciadores (*primers*) e sequenciamento do inserto da Hsp65 presente nos plasmídeos pcDNA3 e pcDNA3A-Hsp65

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 (Mehra, 1987) e AL 035159.1 (Embo, 2002) da Hsp65 de *M. leprae*, devidamente depositadas no GENBANK. Os *primers* foram construídos a partir da seqüência do plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen - Life Technologies®) e da seqüência da proteína Hsp65, (apenas a ORF - *Open Read Frame*). Desta forma, foram desenhados 14 *primers* para o seqüenciamento do inserto da Hsp65 presente no plasmídeo pcDNA3A-Hsp65, sendo que, 7 *primers* destinados ao seqüenciamento da fita *Foward* (F) e os outros 7 *primers* para fita *Reverse* (R). Todos os *primers* foram sintetizados pela empresa Invitrogen - Life Technologies®.

As reações de seqüenciamento 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 seguido pela análise no programa Blast (NCBI). As

análises de alinhamento pelo programa Blast2seq e NEBCUTTER 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 mMACHINE[®] T7 Ultra (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente o plasmídeo pcDNA3A-Hsp65 foi linearizado com a enzima de restrição *Apa* I, em seguida, uma alíquota da amostra foi analisada em gel de agarose 1% para confirmar a digestão total da mesma. Após a linearização, a amostra foi tratada 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, foi centrifugada a 4°C, durante 15 minutos, a 4.000g e o precipitado foi ressuspensão em água. Para a transcrição *in vitro* do mRNA-Hsp65 utilizou-se 1 µg do DNA plasmídeo linearizado juntamente com 10 µl do T7xNTP/ARCA (ATP, CTP, UTP e GTP e o CAP), 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* a amostra foi tratada com 1 µl de DNase durante 15 minutos a 37°C. Para a adição da cauda poliA acrescentou-se 36µl de água, 20µl do tampão 5xE-PAP, 10µl de MnCl₂ 25mM, 10µl da solução ATP e 4µl da enzima E-PAP, e a seguir, a reação foi incubada a 37°C durante 45 minutos. Para recuperar o RNA mensageiro as amostras foram extraídas pelo método clorofórmio-fenol seguido da precipitação em isopropanol (2 horas, -20°C). Após centrifugação (15 minutos, 4°C, 4.000g), o

precipitado foi ressuspensão em 30µl de água e armazenado a -70°C até o momento do uso. O RNA mensageiro proveniente do plasmídeo pcDNA3A-Hsp65 foi denominado de mRNA-Hsp65.

3.6 - Quantificação do RNA mensageiro codificando a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

A quantificação do mRNA-Hsp65 foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm utilizando o aparelho Gene Quant II™ (Pharmacia Biotech, Cambridge - England).

3.7 - Avaliação da integridade do RNA mensageiro codificando a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

O RNA mensageiro foi submetido à eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich, Germany) a 1,5%, em condição desnaturante. Para isto, a amostra (1µg) foi aquecida a 65°C por 15 minutos juntamente com 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 - pH8,0; 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 - pH8,0). A corrida foi realizada a 80V por 1 hora e 30 minutos utilizando o aparelho da Life Technologies Inc., Modelo 250 (BRL). Os padrões de 0,5-10 Kb RNA Ladder (Invitrogen, life technologies) ou de 0,28-6,6 Kb RNA Ladder (Sigma BioSciences) foram utilizados como marcadores de peso molecular. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

3.8 - Avaliação da integridade dos RNAs mensageiros da proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* após a transfecção de células HEK 293, por RT-PCR

Células HEK293 - Human Embryonic Kidney - (ATCC-CRL-1573) foram cultivadas em placas de 24 poços (1×10^6 /poço) em meio DMEM (Invitrogen) até a confluência de 70%. Nesse ponto as células foram lavadas e cultivadas em meio OPTI-MEN (Invitrogen) contendo $2 \mu\text{g}$ de mRNA-Hsp65 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. Células não transfectadas foram utilizadas como controle negativo. As células foram lavadas três vezes com PBS 1X e 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 $200 \mu\text{l}$ de clorofórmio para cada 1ml 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 $500 \mu\text{l}$ 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 ressuspenso em $20-60 \mu\text{l}$ 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 ($1-10 \mu\text{g}$) 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 K Cl e 2 mM de MgCl_2 . Utilizou-se 1

unidade da enzima para cada 1 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. O par de *primers* para a β-actina foram: 5'GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA3'e 5' CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC 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 pcDNA3A-Hsp65 por PCR foi realizada nas condições descritas acima utilizando-se 100ng do DNA pcDNA3A-Hsp65 plasmideal como molde, sendo esse grupo considerado como controle positivo para a reação de PCR.

3.9 - Obtenção da proteína Hsp65 recombinante

Bactérias *E. coli* ER2566 transformadas com o plasmídeo pET28a (Novagen, USA) contendo o gene da Hsp65 foram cultivadas em 2,5L de meio LB líquido (Gibco BRL, USA) contendo canamicina na concentração de 100µg/ml e 300mM do indutor IPTG (*Isopropylthio-β-D-Galactoside*, Gibco BRL) a 37°C sob agitação de 250 rpm por 18 h. Após incubação, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 5.000g por 15 minutos em centrífuga J2HS (Beckman, rotor JS-7.5), ressuspensas em 20ml de tampão fosfato e lisadas em homogeneizador de alta pressão. Após centrifugação a 20.600g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 30ml de tampão fosfato contendo uréia a 5M e agitado por 1 h. A suspensão foi então centrifugada a 20.600g por mais 20 min e o sobrenadante coletado e submetido à cromatografia de afinidade utilizando-se a coluna HiTrap Chelating HP (Amersham Pharmacia, USA), conforme o protocolo especificado pelo fornecedor. A amostra de proteína foi eluída da coluna por concentrações crescentes de imidazol. Após eluição a proteína foi dialisada contra PBS 1X durante 16 h a 4°C.

Para a quantificação da proteína Hsp65 recombinante utilizou-se Coomassie® *Protein Assay Reagent* (Pierce, USA) e para a quantificação de endotoxinas o teste de LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) (Kit QCL-1000 – *Quantitative Chromogenic* – Bio Whittaker – ACAMBREX Company).

3.10 - Avaliação *in vitro* da expressão da proteína Hsp65 por Western blotting

Para avaliar a expressão *in vitro* da proteína Hsp65, células HEK 293 (Human Embryonic Kidney, 6×10^5 células) foram transfectadas com 2 μg de mRNA-Hsp65 utilizando o Transmessenger Transfection Reagent (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Para isto, as células foram plaqueadas (placas de 6 poços), em meio DMEM (Gibco Invitrogen, Corporation) com 10% de SFB (Gibco Invitrogen, Corporation), no dia anterior à transfecção, e após atingirem 80% – 90% de confluência as células receberam o seguinte tratamento: 4 μl do Enhancer R foi adicionado a 94 μl do tampão EC-R, e após a homogeneização, acrescentou-se 2 μl do mRNA-Hsp65. Essa solução foi incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente, e em seguida acrescentou-se 8 μl do Transmessenger Transfection Reagent. Após a homogeneização, a solução foi incubada por 10 minutos, a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 900 μl do meio OPTI-MEM (Gibco Invitrogen, Corporation). Posteriormente, as células HEK 293 foram lavadas com PBS, para retirar o soro (presente no meio DMEM - 10% SFB), e a solução contendo o mRNA-Hsp65 foi gotejada sobre as células HEK 293. Após diversos períodos de incubação (1, 2, 4 e 8 horas) as células foram lisadas com 200 μl do tampão RIPA (50mM Tris - pH= 8,0, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 1% IgePal, 0,5% deoxiglicolato de sódio, e coquetel de inibidores de proteases - Complete, EDTA free - Roche), incubadas por 20 minutos

no gelo, seguido de centrifugação a 11.000 g durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram separados e aplicados em gel de poliacrilamida 10% em condições dissociantes (SDS-PAGE), no sistema *Mini Protean 3 Cell* (Bio-Rad) para a separação das proteínas totais. Para isto, foi adicionado às amostras 5 μ l do tampão da amostra [Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5 com SDS a 2% (m/v) e mercaptoetanol a 3,5% (m/v)], e após fervê-las por 5 minutos, as amostras foram aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas tiveram duração aproximada de 3 horas (100 V). Proteínas com massas moleculares conhecidas foram utilizadas como padrão (Fermentas Life Sciences).

A eletrotransferência das bandas protéicas obtidas por SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose foi realizada no sistema *Mini Protean 3 Cell* (Bio-Rad). A eletrotransferência foi feita em cuba contendo tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM e metanol 20%) por 1,5 horas (100 V). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS-Tween 0,05%) por 2 horas, a temperatura ambiente, e em seguida lavada 3 vezes (10 minutos) com PBS-Tween 0,05%. Posteriormente, a membrana foi incubada por 16 horas, a 4°C, com o anticorpo anti-Hsp65 (anticorpo policlonal de camundongo, gentilmente cedido pelo laboratório do Dr. Célio Lopes Silva), e após as lavagens convencionais (3 vezes - PBS-Tween 0,05%), foi incubada com o anticorpo secundário (fragmento F(ab')₂ anti-IgG de camundongo; Molecular Probes) conjugado com peroxidase alcalina durante 1 hora. Após as lavagens (3 vezes - PBS-Tween 0,05%), a revelação da reação foi detectada com diaminobenzidina (DAB) na presença de peróxido de hidrogênio 0,03% (Peroxidase Substrate Kit DAB - Vector laboratories, Inc.). Cabe ressaltar que para controle positivo utilizou-se a proteína Hsp65 recombinante.

3.11 - Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, do Biotério da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto-USP e do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* foram mantidos em isoladores, em laboratório de nível III de biossegurança, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz controlados e com livre acesso à água e ração.

3.12 - Obtenção de macrófagos peritoneais (Mφs) e linfócitos B (LBs)

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c por lavagem com salina gelada, centrifugados por 5 minutos a 400g e ressuspensos em RPMI 1640 completo (10% de soro bovino fetal (SBF), 100 mM de piruvato de sódio, 100 mM de aminoácidos não essenciais, 200 mM de L-glutamina, 10 mM de β-mercaptoetanol, 100U/ml de penicilina, 100μg/ml de estreptomicina e 10μg/ml de gentamicina). Os linfócitos B foram purificados por seleção negativa de células do baço de camundongos Balb/c. As hemácias foram lisadas com tampão de lise AcK (NH₄Cl 150mM, KCO₃ 10mM, EDTA 0,1mM, pH7,3) durante 3 minutos, no gelo, neutralizadas com RPMI 1640 incompleto e centrifugadas por 5 minutos a 400g. A seguir as células foram lavadas com RPMI 1640 incompleto e centrifugadas por 5 minutos a 400g. As células foram então incubadas com o anticorpo anti-CD43 ligado a “beads” magnéticas (MACS[®] MicroBeads system - Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) e purificadas conforme instruções do fabricante. A fração não marcada constituída por linfócitos B em repouso foi coletada.

3.13 - Obtenção das células dendríticas (CDs) provenientes da medula óssea

As células precursoras das células dendríticas foram obtidas da medula óssea provenientes dos fêmures e tíbias de camundongos Balb/c. Para isto, os fêmures e as tíbias foram retirados e lavados com RPMI1640 incompleto, com o auxílio de uma seringa. As hemácias foram lisadas tampão de lise AcK (NH₄Cl 150mM, KCO₃ 10mM, EDTA 0,1mM, pH7,3) durante 3 minutos, no gelo, neutralizadas com RPMI 1640 completo e centrifugadas por 5 minutos a 400g. A seguir as células foram lavadas com RPMI 1640 incompleto e centrifugadas por 5 minutos a 400g. O *pellet* foi ressuspensão em RPMI 1640 suplementado e as células foram distribuídas (1x10⁶ células/poço) em placas de baixa aderência de 24 poços (Costar – Corning Incorporated), e mantidas durante nove dias em meio RPMI 1640 suplementado. O meio foi trocado a cada 2 dias. O meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 mM de piruvato de sódio, 100 mM de aminoácidos não essenciais, 200 mM de L-glutamina, 10 mM de β-mercaptoetanol, 100U/ml de penicilina, 100μg/ml de estreptomicina, 10μg/ml de gentamicina, 10ng/ml de GM-CSF (BD Bioscience) e 5ng/ml de IL-4 (BD Bioscience).

3.14 - Eletroporação dos macrófagos peritoniais, dos linfócitos B e das células dendríticas com mRNA-Hsp65

As células (1x10⁶ células) foram eletroporadas com ou sem o mRNA-Hsp65 (5μg mRNA/1x10⁶ células). Para isto, as células foram ressuspensas em 400μl de meio OPTI-MEM (Gibco Invitrogen, Corporation), com ou sem mRNA-Hsp65, e eletroporadas (Gene Pulser Xcell™, BIO-RAD) utilizando cubetas de 0,4 cm (BIO-RAD). Os parâmetros adotados para a eletroporação foram: 300V, 150μF e 100Ω.

Após a eletroporação, as células foram coletadas e incubadas em RPMI 1640 [suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 mM de piruvato de sódio, 100 mM de aminoácidos não essenciais, 200 mM de L-glutamina, 10 mM de β -mercaptoetanol, 100U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 10 μ g/ml de gentamicina] durante 24 horas, a 37°C. Após este período a fenotipagem das células dendríticas foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito no item 3.16.

3.15 - Marcação do RNA mensageiro (mRNA-Hsp65) para os ensaios de eletroporação

O mRNA-Hsp65 foi marcado com fluorocromo Alexa 488 (verde), 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 8 μ g a 10 μ g de mRNA-Hsp65 por marcação. O mRNA-Hsp65 a ser marcado foi ressuspense em 19 μ l do tampão de marcação e desnaturado a 95°C durante 5 minutos. As amostras foram colocadas em gelo para a adição de 2 μ l do reagente ULS (contendo o fluorocromo) e mais 1 μ l do tampão de marcação. A reação foi incubada a 90°C por 20 minutos. O mRNA-Hsp65 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. A eficiência da eletroporação com mRNA-Hsp65 fluorescente foi avaliada utilizando-se macrófagos peritoneais (1x10⁶ células/5 μ g mRNA-Hsp65). O protocolo de eletroporação utilizado com os macrófagos peritoneais foi idêntico ao descrito no item 3.14. Após este processo as

células foram ressuspensas em 200 μ l de PBS contendo 1% de formaldeído e analisadas no citômetro de fluxo. Para detecção do mRNA-Hsp65 no interior das células macrófagos peritoneais foram plaqueados em lamínula e incubados na presença de 10 μ g mRNA-Hsp65 marcado com ULS (5x10⁴ células) . Após 15 ou 30 minutos o meio foi retirado e as células lavadas com PBS 1X, fixadas com paraformaldeído 2% por 15 minutos, tratadas com glicina 0,1M e lavadas com PBS 1X. Após montagem lâmina/lamímula as células foram visualizadas em microscópio confocal (Leica TCS SP5 - Leica Microsystems).

3.16 - Fenotipagem dos macrófagos peritoneais, dos linfócitos B e das células dendríticas

CDs, M ϕ s ou LBs em repouso ou submetidos a diferentes tratamentos: eletroporados mRNA-Hsp65 (5 μ g mRNA/1x10⁶ células), somente eletroporados (mock), transfectados por contato com mRNA-Hsp65 (5 μ g mRNA/1x10⁶ células) ou pulsados com proteína recombinante Hsp65 (50 μ g/1x10⁶ células) na presença de Polimixina B (30 μ g/mL). Como controle os 3 tipos celulares também foram tratados com LPS (Sigma-Aldrich, Germany) sonicado 15 minutos a 37 °C (1 μ g/1x10⁶ células). As células foram coletas 24 horas após os estímulos e incubadas por 45 minutos a 4°C na presença do anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc Block™ - 2.4G2 PharMingen, San Diego, CA). Posteriormente, as suspensões celulares (aproximadamente 1x10⁶ células por tubo) foram incubadas, durante 30 minutos a 4°C, com diferentes anticorpos: anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD11b, ou anti-IA^d conjugados com isotiocianato (FITC) e anti-CD11c, anti-CD19 e anti-CD11b conjugado com ficoeritrina (PE). Em seguida as amostras foram lavadas em PBS

contendo 2% de soro fetal bovino e o *pellet* ressuspensão em 200 μ l 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.

3.17 - Preparo das APCs para os ensaios de imunogenicidade

M ϕ s e LBs ou CDs foram purificados ou diferenciados conforme protocolos descritos nos itens 3.12 e 3.13, respectivamente. No dia da imunização as CDs foram coletadas da placa, centrifugadas e ressuspensas em 400 μ l de meio Opti-MEM (Gibco Invitrogen, Corporation), com ou sem mRNA-Hsp65 (5 μ g/1x10⁶ células), e eletroporadas (Gene Pulser Xcell™, BIO-RAD) utilizando cubetas de 0,4 cm (BIO-RAD). Os parâmetros adotados para a eletroporação foram: 300V de voltagem, 150 μ F de capacitância e 100 Ω de resistência. Após a eletroporação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em salina para imunização dos animais. Os M ϕ s ou LBs foram coletados e purificados no dia da imunização, mantidos em meio de cultura [meio RPMI suplementado contém 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 mM de piruvato de sódio, 100 mM de aminoácidos não essenciais, 200 mM de L-glutamina, 10 mM de β -mercaptoetanol, 100U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 10 μ g/ml de gentamicina] até o momento da eletroporação e seguiram o mesmo protocolo descrito acima para as CDs.

3.18 - Ensaio de imunogenidade

Camundongos Balb/c receberam uma transferência adotiva das células por via intravenosa: CDs, Mφs ou LBs ($1 \times 10^6/100\mu\text{l}$) transfectados com $5\mu\text{g}$ de mRNA-hsp65 (eletroporadas) ou apenas eletroporados (mock), por via intravenosa (i.v). Como controle um grupo de camundongos receberam uma dose única de BCG Monreau, gentilmente cedida pela Secretaria da Saúde, (1×10^5 bacilos) por via subcutânea (s.c.). Adicionalmente, outro grupo foi imunizado com $100\mu\text{l}$ de salina por via intravenosa (i.v). Após 15 dias os animais foram sacrificados para dosagem de citocinas da cultura de células do baço e avaliação da linfoproliferação. O soro dos animais também foi coletado para dosagem de anticorpos.

3.19 - Marcação das células com CFSE

Após a obtenção das células totais do baço, dos grupos em questão, as mesmas foram transferidas para um tubo cônico de 15ml (Falcon) contendo 10ml de PBS 1X estéril. A suspensão foi centrifugada a 400g por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1ml de PBS, contadas na Câmara de Neubauer, novamente centrifugadas e foram ressuspensas de forma a ter uma concentração de $2,5 \times 10^6/400\mu\text{l}$. Na seqüência, um volume igual de solução 5mM de CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester* - Invitrogen) diluída 1:2.000 foi adicionada ao tubo e procedeu-se a incubação à temperatura ambiente por 5 minutos com agitação periódica. Decorrido o tempo de incubação, foi adicionado Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco BRL) em cada tubo (aproximadamente 5% do volume total) para interromper o processo de marcação. Novamente foram adicionados 10ml de PBS 1X estéril e centrifugou-se 2 vezes a suspensão a 400g por 10 minutos. As células foram

ressuspensas em RPMI contendo 10% de SFB, contadas e sua concentração acertada ($2,5 \times 10^6$ /ml) para realização do ensaio de proliferação.

3.20 - Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE

Após marcação das células totais do baço com CFSE, as mesmas foram plaqueadas ($2,5 \times 10^6$ células/poço) em placas de 48 poços em meio RPMI 1640 (Sigma, MO, USA) suplementado com 10% de SFB (Gibco, NY, USA) penicilina 100U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml e gentamicina 10 μ g/ml (Gibco, NY, USA). O volume final da cultura foi de 1ml. As células foram estimuladas *in vitro* separadamente com 10 μ g sonicado de BCG, 20 μ g de Hsp65 recombinante presença na de Polimixina B (30 μ g/ml) e 20 μ g/ml de Concanavalina A (ConA Sigma, MO, USA). Após 72 horas de cultura, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo.

3.21 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos

A produção de anticorpos específicos anti-Hsp65 ou anti-BCG foi avaliada por ELISA a partir dos soros pré-ímmunes e soros coletados 15 dias após a imunização, item 3.18. Placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp Nunc-Immuno plates), foram recobertas com 100 μ l da proteína Hsp65 recombinante (10 μ g/ml) ou 100 μ l do sonicado de BCG (10 μ g/ml) diluídos 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 ou anti-IgG2a, 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 50µl de uma solução a 16% de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância foi realizada em 490nm em espectrofotômetro de placa.

3.22 - Cultura de células do baço (ensaio de imunogenicidade)

Quinze dias após a imunização (item 3.18), os animais foram sacrificados e as células do baço (5×10^6 células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços e estimuladas *in vitro* com a proteína Hsp65 recombinante (20µg/ml) na presença de Polimixina B (30µg/ml) ou com o sonicado de BCG (10µg/ml) e com 20µg/ml de Concanavalina A. Os níveis de citocinas no sobrenadante de cultura foram determinados por ELISA após 48 horas, item 3.23.

3.23 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas

Placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates) foram sensibilizadas com 100µl de solução anticorpo monoclonal purificado específico para a citocina de interesse (PharMingen), diluído em tampão de ligação (Na_2HPO_4 0,1M pH 9,0) numa concentração final de 1µg/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 200µl/poço de uma solução de 10% de soro fetal bovino em PBS (PBS/SFB 10%). Após incubação por 1 hora, a temperatura ambiente, as placas

foram novamente lavadas e as amostras foram adicionadas (100µl/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-interleucina biotilado (100µl/poço do anticorpo diluído em PBS / SFB 10% / Tween 20 0,05% numa concentração final de 0,5µg/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 revelador OPD (Sigma) foi adicionado; a reação foi finalizada pela adição de 50µl 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.

3.24 - Preparo das APCs para os ensaios profiláticos e terapêuticos

CDs, Mφs ou LBs foram diferenciados ou purificados conforme protocolos descritos nos itens 3.13 e 3.12, respectivamente. No dia da imunização as CDs foram coletadas da placa, centrifugadas e ressuspensas em 400 µl de meio Opti-MEM (Gibco Invitrogen, Corporation), com ou sem mRNA-Hsp65 (5µg/1x10⁶ células), e eletroporadas (Gene Pulser Xcell™, BIO-RAD) utilizando cubetas de 0,4 cm (BIO-RAD). Os parâmetros adotados para a eletroporação foram: 300V, 150µF e 100Ω. Após a eletroporação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em salina para imunização dos animais por via intravenosa (i.v). Os Mφs ou LBs foram coletados e

purificados no dia da imunização, mantidos em meio completo [RPMI suplementado contém 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 mM de piruvato de sódio, 100 mM de aminoácidos não essenciais, 200 mM de L-glutamina, 10 mM de β -mercaptoetanol] até o momento da eletroporação e seguiram o mesmo protocolo descrito acima para as CDs. Alternativamente as CDs e M ϕ s foram incubadas com mRNA-Hsp65 (5 μ g/1x10⁶ células) em meio Opti-MEM (Gibco Invitrogen, Corporation) por 1 hora e posteriormente centrifugadas e ressuspensas em salina para imunização dos animais. Células APCs também foram incubadas com a proteína recombinante Hsp65 (50 μ g/1 x 10⁶ células) em meio Opti-MEM (Gibco Invitrogen, Corporation) na presença de 30 μ g/ml de sulfato Polimixina B (Sigma) por 4 horas, seguidas de 2 horas em meio RPMI 1640 completo, também na presença de 30 μ g/ml de sulfato de Polimixina B (Sigma), até o momento da imunização.

3.25 - 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 n° 1 (1.107 micobactérias/ml). A suspensão micobacteriana foi centrifugada a 3500rpm por 15 a 20 minutos e o sedimento ressuspenso em 2ml de PBS estéril. A 100 μ l desta suspensão foram adicionados 100 μ l de diacetato de fluoresceína (2 μ g/ml) e 100 μ l de brometo de Etidium (10mg/ml). As micobactérias foram incubadas a 37°C por 10 minutos e a viabilidade foi determinada em microscopia de fluorescência (Leica). As micobactérias que apresentarem viabilidade superior a 80% foram filtradas em pré-

filtro com poro de 8 a 10 μ m (Milipore), para desfazer grumos. Ao material filtrado foi adicionado PBS estéril e a turvação da suspensão ajustada para a escala de McFarland n° 1.

3.26 - Infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e vacinação dos animais com as diferentes abordagens profiláticas e terapêuticas

Para as abordagens profiláticas os animais foram vacinados com os diferentes tipos celulares células: CDs, M ϕ s ou LBs (1×10^6) transfectados com 5 μ g de mRNA-Hsp65 (eletroporados), apenas eletroporados (mock) ou pulsadas com a proteína recombinante Hsp65, por via intravenosa (i.v). Como controle um grupo de camundongos receberam uma dose única de BCG Monreau, gentilmente cedida pela Secretaria da Saúde, (1×10^5 bacilos) por via subcutânea (s.c.). Adicionalmente, outro grupo foi imunizado com 100 μ l de salina por via intravenosa (i.v). Trinta dias após a vacinação foram infectados com 100 μ l de suspensão contendo 1×10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv, por via intranasal (i.n). Também foram realizados ensaios com 2 imunizações, com intervalo de 15 dias entre a primeira e a segunda dose e a infecção realizada 15 dias após a segunda dose.

Para avaliar os efeitos terapêuticos os animais foram infectados com 100 μ l de suspensão contendo 1×10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv, por via intranasal (i.n). Trinta dias após a infecção os animais receberam as células por transferência adotiva: CDs, M ϕ s ou LBs (1×10^6) transfectados com 5 μ g de mRNA-Hsp65 (eletroporados), apenas eletroporados (mock) ou pulsadas com 50 μ g da proteína recombinante Hsp65, por via intravenosa (i.v). Outro grupo foi imunizado com 100 μ l de salina por via intravenosa (i.v). Em alguns casos os animais receberam 2 doses

com intervalo de 15 dias entre a primeira e a segunda doses e os resultados avaliados 15 dias após a segunda dose.

Alternativamente foram avaliados os efeitos profiláticos e terapêuticos de animais imunizados por via sub-cutânea (s.c.) com 2 doses de células: CDs ou Mφs (1×10^6) incubados com $5 \mu\text{g}$ de mRNA-Hsp65 (contato), células apenas incubadas com meio (mock) ou pulsadas com $50 \mu\text{g}$ da proteína recombinante Hsp65. Na profilaxia, as imunizações ocorreram com um intervalo de 15 dias e a infecção realizada 15 dias após a segunda dose. Na terapia, 30 dias depois da infecção os animais receberam 2 doses com intervalo de 15 dias e os resultados foram avaliados 15 dias após a segunda dose.

3.27 - Avaliação do pulmão dos animais infectados

Trinta dias após a infecção nos modelos de proteção e trinta ou 15 dias após o tratamento para a avaliação terapêutica os animais foram sacrificados e os pulmões coletados e colocados em placas de Petri estéreis contendo 2ml de meio RPMI-1640 incompleto. Os pulmões foram pesados e seus lóbulos separados para os diversos procedimentos experimentais: o lóbulo superior direito foi colocado em um tubo contendo 10ml de formol tamponado para posterior processamento e análise histológica (item 3.30), os lóbulos inferior e médio direitos foram coletados em placas de Petri de 22mm de diâmetro (Corning) para determinação do número de UFC (item 3.29), os lóbulos esquerdos superior e inferior foram coletados para homogeneização e dosagem de citocinas (item 3.23).

3.28 - Obtenção do homogenato do pulmão

Os lóbulos superiores e inferiores esquerdos foram coletados em tubos contendo 2ml de RPMI-1640 incompleto e armazenados a -20°C. Para a detecção de citocinas, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (IKA), e após este processo, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm, 4°C, durante 15 minutos. Em seguida o sobrenadante foi coletado para a quantificação das citocinas conforme descrito no item 3.23.

3.29 - Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFCs)

Os animais infectados - vacinados ou tratados - foram sacrificados e os pulmões foram coletados, pesados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo de 50ml contendo 15ml 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 (250 rpm), 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 em PBS (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000) e 100µl dessas amostras diluídas foram plaqueadas em meio 7H11. O número de unidades formadoras de colônia foi avaliado após incubação a 37°C, por 28 dias.

3.30 - Análise histológica dos pulmões

Para a análise histológica do pulmão dos animais infectados - vacinados ou tratados - o lóbulo superior direito do pulmão foi coletado e fixado em formol

tamponado com fosfato. O material foi processado e cortes histológicos (5 μ m) foram realizados. As lâminas obtidas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e analisadas em microscópio de luz.

3.31 - Análise morfométrica dos pulmões

A quantificação do infiltrado inflamatório no tecido pulmonar dos animais imunizados e infectados (profilaxia) ou infectados e tratados (terapia) foi realizada utilizando o programa de análise de imagens Image J (Image J, Version 1.42I, National Institutes of Health). Para tanto foram fotografados 10 campos, aleatórios, de cada lâmina. A cada uma das imagens foi aplicado um gradícuo de dimensões conhecidas, composto de 100 pontos. A contagem dos pontos correspondentes às regiões com infiltrado inflamatório correspondeu à porcentagem de área inflamada por seção tecidual. A média dos 10 campos forneceu a porcentagem de área de pulmão inflamada.

3.32 - Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão dos grupos e analisados pelo programa Prism 5.0. (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças entre os grupos foram calculadas por ANOVA seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 - Avaliação da integridade e sequenciamento dos plasmídeos utilizados como molde para a produção de mRNA-Hsp65

O mRNA foi produzido utilizando como molde o plasmídeo pcDNA3A-Hsp65. Este plasmídeo, por sua vez, contém como inserto a região de *open read frame* (ORF) do gene que codifica a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*.

Os plasmídeos pcDNA3 (vetor parental) e pcDNA3A-Hsp65 (vetor recombinante) foram obtidos através do kit comercial QIAGEN® (item), e utilizados como *template* para a confecção do RNA mensageiro (mRNA-Hsp65). A integridade dos plasmídeos foi verificada por eletroforese em gel de agarose utilizando enzimas de restrição. O pcDNA3 digerido com *Bam* HI mostrou perfil eletroforético correspondente ao tamanho do vetor linear, com uma banda de 5.4kb, Figura 1. A digestão do pcDNA3A-Hsp65 com *Apa* I e *Bam* HI produziu 2 bandas, uma de 5.4kb representando o vetor (pcDNA3), e a outra de 1.8kb, representando apenas o inserto da Hsp65, sem a porção não codificante 5', Figura 1. Esses resultados mostram a integridade do material, confirmam o perfil eletroforético das amostras e também mostram a pureza das mesmas, livre de RNA total bacteriano. Cabe ressaltar que todas as amostras tiveram índices de endotoxina menores que 0,1EU por µg de DNA, portanto aceitáveis para testes *in vivo*, como recomendado pela farmacopéia americana e européia.

Com o intuito de verificar a sequência do plasmídeo usado como molde para produção do mRNA-Hsp65, este foi sequenciado. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela I.

Tabela I. *Primers* construídos para seqüenciamento dos plasmídeos

| <i>Primers F</i> | <i>Primers R</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 |

As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE HealthCare). Após o recebimento dos dados brutos do seqüenciamento, estes foram tratados e analisados utilizando a plataforma Phred-Phrap-Consed. Os dados gerados a partir dessa análise foram analisados utilizando a ferramenta Blast.

A análise dos dados obtidos do seqüenciamento permitiu determinar 89% da extensão do inserto. A Figura 2 mostra o resultado do Blastn contra a sequência gerada pelo seqüenciamento do plasmídeo pcDNA3A-Hsp65. Os resultados obtidos são condizentes com a sequência codificante da proteína clonada nesse vetor.

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

Conforme visualizado na Figura 3, após eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5%, o mRNA-Hsp65 mostrou um perfil eletroforético correspondente a uma banda de aproximadamente 1,8kb (Figura 3, canaletas 2 e 3). Cabe ressaltar que a comprovação da obtenção do RNA mensageiro foi observada com o tratamento com a RNase A, o qual aboliu as bandas obtidas anteriormente (dados não mostrados). Outro aspecto importante na confecção dos RNAs mensageiros utilizando o Kit mMESSAGE mMACHINE[®] T7 Ultra (Ambion), é a adição CAP (7-metilguanossina) na extremidade 5' e cauda poliA na extremidade 3' do mRNA, sendo que a adição da cauda poliA resulta em um aumento de aproximadamente 50 pares de base, gerando, assim, um RNA mensageiro pronto para ser traduzido em uma célula eucariótica. Essa adição da cauda poliA pode ser verificada na Figura 3, sendo que a canaleta 2 representa o mRNA gerado antes da reação de poli-adenilização e a canaleta 3 o mRNA depois da reação de poli-adenilização. Cabe ressaltar, novamente, que todos os mRNAs produzidos tiveram índices de endotoxina menores que 0,1EU por μg de mRNA, como recomendado pela farmacopéia americana e européia e portanto aceitáveis para testes *in vivo*.

4.3 - Avaliação da integridade dos RNAs mensageiros da proteína Hsp65 por RT-PCR

A fim de avaliar a integridade do mRNA-Hsp65 foi feita a extração do RNA total das células 293 HEK transfectadas com 2 μg de mRNA-Hsp65 previamente complexoado 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 das células. Células não transfectadas foram utilizadas como controle negativo. Como mostrado na Figura 4 existe uma banda específica para o mRNA da Hsp65 apenas nas células que receberam mRNA-Hsp65 demonstrando a especificidade dos *primers* utilizados, nos tempos de 30 minutos até 4 horas. Além disso, as bandas apresentaram o tamanho esperado (400pb) 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 pcDNA3A-Hsp65. Na Figura 4 é possível verificar que o mRNA-Hsp65 encontra-se detectável apenas até 4 horas após o processo de transfecção das células. Após 8 horas não foi mais possível detectar a mensagem para a Hsp65, sugerindo que o RNA esteja sendo traduzido. No entanto, não podemos descartar que as moléculas estejam sendo degradadas pela vias de controle de expressão da célula. Baseados nesses dados podemos sugerir que após a entrada na célula, *in vitro*, a molécula de mRNA-Hsp65 se mantém detectável por um período de até 4 horas.

4.4 - Avaliação *in vitro* da expressão da proteína Hsp65 por *Western blotting*

O experimento para a detecção da proteína Hsp65 por *Western blotting* (WT) foi realizado após a transfecção de células HEK 293 com o mRNA-Hsp65. A análise da membrana de nitrocelulose mostrou que após a transfecção das células HEK 293 a proteína Hsp65 foi detectada nos períodos de 1h, 2h e 4h (Figura 5, canaletas 6, 5 e 4, respectivamente) porém, em períodos superiores (8, 24h e 36 horas) a proteína não foi detectada (dados não mostrados), sugerindo que após 4 horas o mRNA-Hsp65 possa ter sido degradado ou afetado por algum controle pós-traducional. Este intervalo pequeno de produção de proteína (1 – 4 horas) influenciou na escolha do

momento de administração das APCs. Células HEK 293 não transfectadas foram utilizadas como controle negativo, e neste caso, não foi observado a presença de banda na altura da Hsp65 (Figura 5, canaleta 3). A proteína recombinante Hsp65 foi utilizada como controle positivo (Figura 5, canaleta 1). As células transfectadas e o controle positivo apresentaram o peso molecular de aproximadamente 65kDa, conforme indicado pelo padrão de peso molecular (Figura 5, canaleta 2). Cabe ressaltar que esses experimentos para a detecção da proteína Hsp65 foram realizados com a linhagem de células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*), uma vez que o anticorpo anti-Hsp65 disponível foi produzido em camundongo, e para evitar reações cruzadas optou-se por uma linhagem de células humanas. Esses resultados de detecção da proteína são condizentes com os resultados de RT-PCR que também mostram a presença da mensagem da proteína até um período de 4 horas, Figura 4. A detecção da mensagem e da proteína Hsp65 revelou que o processo de tradução acontece de maneira rápida e transiente nas células transfectadas, já que com oito horas nem a mensagem nem a proteína são detectáveis. Baseados nesses resultados, nos experimentos de imunização, optamos por administrar as células logo após a eletroporação, diferentemente de alguns trabalhos que administram essas células somente após um determinado período de incubação.

4.5 - Obtenção das APCs

Foram obtidos em média 1×10^7 Mφs da cavidade peritoneal de cada camundongo Balb/c por lavagem com salina gelada, sendo que praticamente 100% das células eram CD11b, Figura 6A. Na obtenção de LBs, pelo processo de seleção negativa, utilizando *beads* magnéticas, o rendimento variou entre os animais,

contudo em média recuperamos entre 20 e 30% de linfócitos B em relação ao número de células totais do baço, com pureza superior a 90%, Figura 6B.

Na diferenciação das células dendríticas provenientes da medula óssea a porcentagem total de células CD11c⁺ obtidas foi geralmente de 60-70%. Para a diferenciação através de precursores da medula óssea utilizamos um procedimento compatível com os protocolos clássicos descritos na literatura, usando IL-4 (5ng/ml) e GM-CSF (10ng/ml), Figura 6C. Nos protocolos vacinais a pureza desejada é de aproximadamente 95%. Uma alternativa para obter uma população apenas de CD11c seria a utilização de *beads* magnéticas, entretanto esse procedimento teria um alto custo, diante disso optamos por utilizar uma população mista de células com predominância de CDs, mas com a presença de macrófagos expressando CD11b e também de monócitos.

4.6 - Marcação do RNA mensageiro (mRNA-Hsp65) e ensaios de eletroporação e viabilidade celular

Adotando-se os parâmetros de eletroporação descritos no item 3.14, M ϕ s peritoneais, LBs e CDs foram eletroporados com 5 μ g de mRNA-Hsp65 fluorescente. Conforme demonstrado na Figura 7, houve incorporação de mRNA-Hsp65 nos 3 tipos celulares, sendo que nas CDs houve cerca de 80% de incorporação (Figura 7A), nos M ϕ s 74% (Figura 7B) e 88% nos LBs (Figura 7C).

Macrófagos peritoneais também foram colocados em contato com mRNA-Hsp65 fluorescente por 30 minutos e visualizados em microscópio confocal. As imagens mostradas na Figura 8 confirmam a internalização das moléculas de mRNA marcadas com Alexa 488 pelas células.

Como a eletroporação é um processo de transfecção “drástico”, mais quando comparado a outros métodos como cloreto de cálcio e uso de lipossomas, todas as células submetidas à eletroporação tiveram sua viabilidade avaliada. Uma hora após o processo de transfecção foi feita a contagem das células viáveis em microscópio óptico utilizando corante azul de Tripan. Os resultados reunidos na Tabela II mostram que a viabilidade para os 3 tipos celulares submetidos ao processo de eletroporação variou entre 80 e 90%. A viabilidade das APCs não submetidas à eletroporação foi geralmente superior a 90% (dados não mostrados).

Tabela II: Viabilidade das APCs 1 hora após eletroporação (Azul de Tripan)

| Tipos Celulares | Viabilidade ^a |
|-----------------|--------------------------|
| DC | 85% ± 5.0 |
| LB | 82% ± 2.5 |
| Mφ | 87% ± 3.5 |

^a Os

resultados são representativos de 3 experimentos realizados independentemente.

4.7- Avaliação da expressão de moléculas co-estimuladoras nas APCs: LBs, Mφs, CDs

Para análise fenotípica das APCs foram realizados diferentes ensaios com células não tratadas, estimuladas por contato com mRNA-Hsp65, eletroporadas com mRNA-Hsp65, somente eletroporadas (mock), ou pulsadas com proteína recombinante Hsp65. Como controle as APCs também foram tratadas com LPS. Vinte quatro horas após os diferentes estímulos as células foram coletadas e avaliadas quanto à expressão de CD80, CD86, CD40 e MHC de classe II (MHC-II). Conforme observado nos histogramas das Figuras 9, 10 e 11 os diferentes tipos

celulares apresentaram algumas diferenças quanto ao perfil de expressão das moléculas co-estimuladoras. Na Figura 9, que representa o perfil de expressão em LBs, observa-se que as células estimuladas com mRNA (contato) ou pulsadas com proteína não mostraram alterações no perfil de expressão das moléculas avaliadas. Por outro lado, as células apenas eletroporadas (mock) mostraram um aumento da expressão de CD40 e um discreto aumento de CD86. LBs eletroporados com mRNA aumentaram a expressão de CD80 e CD86.

Conforme representado na Figura 10 os M ϕ s estimulados por contato com mRNA, apenas eletroporados (mock) e eletroporados com mRNA tiveram expressão aumentada de CD80, CD86, CD40 e leve aumento na expressão de MHC-II. As células tratadas com a proteína modularam positivamente a expressão de CD86.

Na Figura 11 está representado o perfil de ativação de CDs. O tratamento das células com mRNA (contato e eletroporado) ou com a proteína provocou aumento da expressão de CD80, CD86, CD40. As células mock mostraram uma regulação positiva apenas de CD86 e CD40.

Tomados juntos esses resultados representados nos histogramas das Figuras 9, 10 e 11 revelam que de forma geral a expressão de MHC-II manteve-se praticamente inalterada nas 3 populações celulares. Além disso, os LBs tiveram menor variação na expressão das moléculas de co-estimuladoras se comparados com os M ϕ s e CDs, com tendência a um perfil de APC não ativada. Por outro lado M ϕ s e CDs quando submetidos a qualquer um dos tratamentos tendem a apresentar um fenótipo de APC madura, ou pelo menos moderadamente madura.

4.8 - Imunogenicidade

Para a realização dos experimentos de imunogenicidade os animais foram imunizados com dose única (1×10^6 células em $100 \mu\text{l}$ de salina) por via intravenosa (i.v). Foram imunizados 6 grupos experimentais (n=3): a) LBs eletroporados (mock); b) LB eletroporados com mRNA-Hsp65; c) M ϕ s eletroporados (mock), d) M ϕ s eletroporados com mRNA-Hsp65, e) CDs eletroporadas (mock); f) CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65. Além dos grupos controles (n=3): Salina e BCG. Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e foram avaliadas a capacidade proliferativa e a produção de citocinas das células do baço quando estimuladas *in vitro* com a proteína recombinante Hsp65 ou lisado de BCG. Também foi coletado o soro dos animais antes e 15 dias após as imunizações para dosagem de anticorpos específicos.

4.8.1 - Proliferação de células totais do baço de animais vacinados

A avaliação da capacidade proliferativa de células obtidas do baço de animais vacinados foi realizada após o cultivo destas, por 72 horas, na ausência de estímulo específico; com a proteína recombinante Hsp65 ou com lisado de BCG. A Figura 12 mostra que nos animais imunizados com: LBs eletroporados com mRNA-Hsp65, CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 e com BCG a capacidade de proliferação foi significativamente maior que nos animais que imunizados com salina. Os animais vacinados com CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 também apresentaram proliferação significativamente maior que os animais imunizados com CDs mock, M ϕ s mock e eletroporados com mRNA-Hsp65. Por outro lado M ϕ s não mostraram a mesma capacidade de induzir proliferação na fase analisada. Um fato interessante é

que nos grupos imunizados com LB mRNA-Hsp65 e CD mRNA-Hsp65 nota-se proliferação celular mesmo na ausência de re-estimulação *in vitro* com a proteína Hsp65. Todos os animais apresentaram células viáveis, capazes de proliferar frente ao estímulo policlonal - Concanavalina A (ConA).

4.8.2 - Produção de citocinas por células totais do baço de animais vacinados

A avaliação da capacidade imuno-estimuladora das diferentes estratégias vacinais também foi avaliada pela quantificação da produção de citocinas (IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ). Estes experimentos foram realizados 15 após a imunização utilizando-se células totais provenientes de baços de animais imunizados estimuladas *in vitro*, por 48 horas, com proteína Hsp65 ou com lisado de BCG. As células provenientes do baço de animais imunizados com BCG e com M ϕ s eletroporados com mRNA-Hsp65, foram capazes de produzir níveis significativos de IL-5 em relação ao grupo salina. Animais imunizados com CDs eletroporadas (mock) e CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 produziram quantidades de IL-5 significativamente maiores que todos os demais grupos experimentais, Figura 13.

A cultura de células do baço de animais imunizados com BCG e com LBs eletroporados com mRNA-Hsp65, foram capazes de produzir níveis significativos de IL-10 em relação ao grupo salina. Os grupos imunizados com CDs eletroporadas (mock) e CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 produziram níveis de IL-10 significativamente maiores que os demais grupos experimentais, Figura 14.

Porém, quando dosamos a produção de IFN- γ foram detectadas quantidades significativas dessa citocina nas culturas de células do baço de animais imunizados com BCG e com LBs eletroporados com mRNA-Hsp65, em relação ao grupo salina.

Mais uma vez, as células recuperadas dos camundongos imunizados com CDs (mock) e CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 produziram níveis de IFN- γ significativamente maiores que os demais grupos experimentais, Figura 15.

Assim como ocorreu nos ensaios de linfoproliferação em alguns casos houve produção de citocinas por células recuperadas dos animais imunizados mesmo sem o re-estímulo *in vitro* com a proteína Hsp65, Figuras 13, 14 e 15.

4.8.3 - Produção de anticorpos anti-Hsp65 e anti-BCG

Para verificar a ativação da resposta imune humoral, inicialmente avaliamos a produção de anticorpos específicos contra a proteína alvo de nosso estudo, através da detecção dos níveis de anticorpos dos isotipos IgG2a e IgG1, característicos do padrão Th1 e Th2, respectivamente. Tais análises foram conduzidas utilizando soro de camundongos pré-ímmunes e imunizados. Como podem ser verificadas na Figura 16 a imunização com as diferentes estratégias não induziu uma produção significativa de nenhum dos isotipos de anticorpos. Somente a imunização com BCG gerou uma produção estatisticamente significativa de anticorpos do isotipo IgG1 quando comparado com soro pré-ímmune e com os outros grupos experimentais.

4.9 - Profilaxia (1 dose)

A capacidade protetora induzida pelas diferentes estratégias vacinais foi avaliada frente ao desafio com cepa virulenta de *M. tuberculosis* (Mtb) H37Rv. Camundongos Balb/c foram imunizados com as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, 1×10^6 células, i.v) e APCs eletroporadas com

mRNA-Hsp65 (1×10^6 células, i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, i.v. Trinta dias após a imunização os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos de *M. tuberculosis* por via i.n Trinta dias após a infecção os pulmões foram extraídos para: a) dosagem de citocinas da cultura de células do pulmão, b) determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs) e c) análise histopatológica do tecido pulmonar.

4.9.1- Produção de citocinas da cultura de células do pulmão

Com intuito de dosar os níveis de IL-4 e IFN- γ células do pulmão de animais imunizados e desafiados com Mtb foram cultivadas *in vitro* na presença da proteína Hsp65 ou do lisado de BCG. A produção de IL-4 foi significativamente maior apenas nos animais imunizados com células CDs mock e CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65, quando comparado ao grupo salina e os demais grupos experimentais incluindo o grupo BCG, Figura 17. Conforme se pode observar na Figura 18 os grupos de animais imunizados com BCG produziram níveis de IFN- γ significativamente maiores que os animais apenas infectados (salina) e os vacinados com LBs mock, LBs eletroporados com mRNA-hsp65, M ϕ s mock e M ϕ s eletroporados com mRNA-Hsp65. Os grupos de animais imunizados com CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 produziram níveis de IFN- γ significativamente maiores que os animais apenas infectados (salina) e também e os vacinados com LBs mock, LBs eletroporados com mRNA-hsp65, M ϕ s mock e M ϕ s eletroporados com mRNA-Hsp65.

Assim como ocorreu nos ensaios de imunogenicidade, em alguns casos houve produção de citocinas por células recuperadas dos animais imunizados com CDs

eletroporadas mesmo sem o re-estímulo *in vitro* com a proteína Hsp65, Figuras 17 e 18.

4.9.2 - Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFCs)

Os animais vacinados com as diferentes estratégias foram desafiados e 30 dias após a infecção foram sacrificados e tiveram o pulmão coletado e processado para determinação das UFCs conforme descrito no item 3.29. Após 28 dias de incubação foi feita a contagem das UFCs. Conforme pode ser visualizado na Figura 19, os animais vacinados com: LBs eletroporados (mock), LBs eletroporados com mRNA-Hsp65, Mφs peritoneais eletroporados (mock), Mφs peritoneais eletroporados com mRNA-Hsp65, CDs eletroporadas (mock) ou CDs eletroporados com mRNA-Hsp65 - não apresentaram diminuição das UFCs quando comparados ao grupo salina. O grupo de camundongos imunizados com BCG obteve uma redução significativa das UFCs. Adicionalmente foi avaliada as UFCs de animais que receberam APCs pulsadas com proteína, contudo nesses grupos também não foi observada redução da carga bacilar, Figura 20.

4.9.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar

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 foram coletados e analisados trinta dias após o desafio. Conforme visualizado na Figura 21 os animais vacinados com: APCs apenas eletroporadas

(mock, i.v.), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v.), APCs pulsadas com a proteína Hsp65 (i.v.) - apresentam infiltrados inflamatórios locais e também inflamação peribronquiolar e perivascular. O grupo de animais que só recebeu salina apresenta um comprometimento parcial parênquima pulmonar com presença de focos inflamatórios compostos de células mononucleares, sobretudo de linfócitos e macrófagos além de uma inflamação peribronquiolar e perivascular. O grau de comprometido do tecido pulmonar entre o grupo salina e os imunizados com APCs é bastante parecido. O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal. O grupo BCG apresentou uma melhor preservação do parênquima com poucos focos inflamatórios geralmente associados aos brônquios e vasos.

A análise morfométrica não revela diferenças no grau de comprometimento do tecido pulmonar entre as diferentes estratégias vacinais e o grupo salina. No grupo BCG a porcentagem de área de pulmão inflamada foi menor que no grupo salina. Os dados de morfometria corroboram o perfil histopatológico visualizado nos cortes histológicos. O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal, Figura 22.

4.10 - Profilaxia (2 doses)

A capacidade protetora induzida por 2 imunizações com as diferentes estratégias vacinais foi avaliada frente ao desafio com cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, 1×10^6 células, i.v.) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (1×10^6 células, i.v.) e APCs pulsadas com a proteína Hsp65 (1×10^6 células, i.v.). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5

bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, i.v. Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v.), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v.), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v.) e salina (i.v.). Quinze dias após a segunda dose os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* por via i.n Trinta dias após a infecção os pulmões foram extraídos para: a) dosagem de citocinas do homogenato do pulmão, b) determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs) e c) análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar.

4.10.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão

A dosagem de citocinas diretamente do homogenato do pulmão dos animais vacinados e infectados com Mtb revela uma redução dos níveis de TNF- α nos camundongos imunizados com 2 doses de CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 ou CDs pulsadas com proteína Hsp65 em relação ao grupos salina (animais infectados e tratados com salina), Figura 23.

A dosagem de IL-12 revela uma redução dos níveis dessa citocina no grupo BCG. Esse fenômeno é considerado normal já que o BCG está relacionado com a indução de um padrão misto de resposta durante a TB. Esse padrão foi observado durante os ensaio de imunogenicidade com a produção de anticorpos do subtipo IgG1 e produção significativa de IL-5 e IL-10, Figuras 13, 14 e 16. Nos demais grupos não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-12 quando comparados com o grupo salina, Figura 24.

Quanto ao IFN- γ não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais com o controle imunizado com salina, Figura 25.

4.10.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)

Quando avaliamos as UFCs, em nenhum dos grupos vacinados com as diferentes abordagens profiláticas houve diminuição da carga bacilar quando comparados com o grupo que recebeu salina. O grupo de camundongos imunizados com BCG obteve uma redução significativa das UFCs, Figura 26.

4.10.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar

Em todos os grupos experimentais observamos uma pneumonia tuberculosa com comprometimento do parênquima pulmonar apresentando um infiltrado inflamatório difuso com presença de células mononucleares de localização intra-alveolar, além de uma inflamação peribronquiolar e perivascular. O grupo BCG apresentou uma melhor preservação do parênquima com alguns focos inflamatórios peribronquiolares e perivasculares e uma menor congestão do tecido pulmonar, Figura 27. Quando comparamos esses resultados com os experimentos de profilaxia 1 dose (Figura 21) parece ter havido nesses últimos uma maior congestão do tecido pulmonar. Acreditamos que isso possa ter ocorrido devido ao fato de se tratarem de inóculos distintos de Mtb que podem apresentar algumas diferenças no número total de micobactérias ou mesmo na virulência da cepa. No entanto, não consideramos que isso tenha prejudicado as análises dos resultados uma vez que dentro do mesmo experimento um só inóculo foi utilizado.

A análise morfométrica não revela diferenças no grau de comprometimento do tecido pulmonar entre as diferentes estratégias vacinais. Conforme esperado, no grupo BCG a porcentagem de área de pulmão inflamada foi menor que no grupo salina. O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal, Figura 28.

Com base nos parâmetros analisados podemos dizer que a imunização de camundongos Balb/c com 1 ou 2 doses de APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65, administradas por via endovenosa, foi incapaz de gerar proteção contra a TB experimental.

4.11 - Terapia (1 dose)

As propriedades terapêuticas das diferentes estratégias foram avaliadas em animais infectados com cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção receberam as abordagens terapêuticas: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v.), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v.), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v.). O grupo controle recebeu salina, i.v. Trinta dias após a imunização os animais foram sacrificados e tiveram os pulmões coletados para: a) dosagem de citocinas do homogenato do pulmão, b) determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs) e c) análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar.

4.11.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão

A dosagem de citocinas IL-10, TNF- α , IL-12 e IFN- γ diretamente do homogenato do pulmão dos animais infectados com *M. tuberculosis* e tratados com as diversas

abordagens terapêuticas não apresentou diferenças significativas quando comparada com os níveis de citocinas do grupo salina (animais infectados e tratados com salina), Figuras 29, 30, 31 e 32.

4.11.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)

Quando avaliamos o número de bactérias presentes no pulmão em nenhum dos grupos vacinados com as diferentes abordagens terapêuticas verificamos diminuição da carga bacilar quando comparados com o grupo salina, Figura 33.

4.11.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar

A análise histológica revela, conforme demonstrado na Figura 34, que os animais infectados e tratados com salina apresentam uma pneumonia tuberculosa com comprometimento parcial do parênquima pulmonar apresentando um intenso infiltrado inflamatório caracterizado pela presença de células mononucleares de localização intra-alveolar associado à presença de BALT (do inglês: bronchus-associated lymphoid tissue, tecido linfóide associado ao brônquio). Notam-se também numerosos macrófagos xantomatosos sugestivos da presença de bacilos. Não parece haver grandes diferenças entre o grupo salina e os demais grupos experimentais. O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal. As análises morfométricas indicam um comprometimento parcial do tecido pulmonar com cerca de 40% de área de pulmão inflamada, não havendo diferenças entre os diferentes grupos experimentais, Figura 35.

Com base nos parâmetros analisados: produção de citocinas, carga bacilar e análise histológica e morfométrica, pode-se dizer que essa estratégia terapêutica utilizando 1 dose das diferentes abordagens não se mostrou eficiente no tratamento da tuberculose experimental.

4.12 - Terapia (2 doses)

Diante da ausência de efeitos terapêuticos na abordagem terapêutica com 1 dose foi realizado o tratamento com 2 doses de APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v.), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v.), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v.). O grupo controle recebeu salina, i.v. Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v.), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v.), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v.). O grupo controle recebeu salina, i.v. Quinze dias após a última dose os pulmões foram coletados para: a) dosagem do homogenato do pulmão, b) determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs) e c) análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar.

4.12.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão

As dosagens das citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α diretamente do homogenato do pulmão dos animais infectados com *M. tuberculosis* e tratados com as diversas abordagens terapêuticas (2 doses) não revelaram diferenças significativas quando

comparadas com o grupo salina (animais infectados e tratados com salina), Figuras 36, 37 e 38.

4.12.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)

Não foram encontradas diferenças significativas na carga bacilar nos pulmões dos animais infectados e tratados com as diferentes abordagens terapêuticas quando comparadas com o número de bacilos no grupo controle (animal infectado e tratado com salina), Figura 39.

4.12.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar

A análise histológica mostra grande semelhança com os resultados obtidos na terapia 1 dose, Figura 34. Em todos os grupos infectados e tratados há existência de uma pneumonia tuberculosa, bastante parecida àquela encontrada no grupo salina. O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal, Figura 40. As análises morfométricas indicam um comprometimento parcial do tecido pulmonar com cerca de 50% de área de pulmão inflamada, não havendo diferenças entre os diferentes grupos experimentais, Figura 41.

Com base nos parâmetros analisados podemos dizer que a estratégia terapêutica utilizando 2 dose de APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65, transferidas por via endovenosa, não se mostrou eficiente no tratamento da tuberculose experimental.

4.13 - Profilaxia 2 doses (via subcutânea)

A escolha da via de imunização pode ser determinante para o sucesso de um modelo vacinal dessa forma foram avaliados os efeitos profiláticos em animais imunizados por via sub-cutânea (s.c.) e infectados com *M. tuberculosis*. Para tal camundongos Balb/c foram imunizados com 2 doses de células: CDs ou Mφs (1×10^6) incubados com 5μg de mRNA-Hsp65 (contato), células apenas incubadas com meio (mock) ou pulsadas com 50μg da proteína recombinante Hsp65. As imunizações ocorreram com um intervalo de 15 dias e a infecção foi realizada 15 dias após a segunda dose. Trinta dias após a infecção os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para: a) dosagem do homogenato do pulmão, b) determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)) e c) análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar.

4.13.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão

A dosagem de IL-12 e IFN-γ diretamente do homogenato do pulmão dos animais imunizados com as CDs ou Mφs e infectados com *M. tuberculosis* não apresentou diferenças significativas quando comparadas com o grupo de animais imunizados com salina, Figuras 42 e 43. Os animais controles que receberam BCG não apresentaram redução nos níveis de IL-12 e IFN-γ. Em um outro experimento descrito anteriormente foi observada uma diminuição nos níveis de IL-12 no pulmão de animais vacinados com BCG, Figura 24. Embora tenhamos utilizado a mesma cepa de BCG em todos os experimentos os lotes foram diferentes. Acreditamos que isso possa ter provocado algumas variações nos resultados.

4.13.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)

Não foram encontradas diferenças significativas na carga bacilar no pulmão dos animais imunizados (CDs ou Mφs pulsados com mRNA-Hsp65 ou com proteína Hsp65) e infectados quando comparados com o grupo controle (animal imunizado com salina e infectado), Figura 44.

4.13.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar

Conforme visualizado na Figura 45 os animais vacinados com CDs ou Mφs pulsados com mRNA-Hsp65 ou com proteína Hsp65 apresentaram infiltrados inflamatórios locais e também inflamação peribronquiolar e perivascular. O grupo de animais que só recebeu salina apresentou um comprometimento parcial parênquima pulmonar com presença de focos inflamatórios compostos de células mononucleares, sobretudo de linfócitos e macrófagos além de uma inflamação peribronquiolar e perivascular. O grau de comprometido tecidual bem como o aspecto histopatológico do tecido pulmonar entre o grupo salina e os imunizados com APCs é bastante parecido. O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal. O grupo BCG apresentou uma melhor preservação do parênquima do pulmão com poucos focos inflamatórios geralmente associados aos brônquios e vasos.

As análises morfométricas indicam um baixo comprometimento do tecido pulmonar com cerca de 20% de área de pulmão inflamada, não havendo diferenças entre os grupos que receberam CDs ou Mφs pulsados com mRNA-Hsp65 ou com proteína Hsp65 e o grupo salina, Figura 46. O grupo BCG apresentou um infiltrado

inflamatório escasso com um comprometimento de apenas 10% do tecido do pulmão.

Com base nos parâmetros analisados: produção de citocinas, carga bacilar e análise histológica e morfométrica, pode-se dizer que essa estratégia profilática não se mostrou eficiente no tratamento da tuberculose experimental.

4.14 - Terapia 2 doses (via subcutânea)

Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam com 2 doses de células: CDs ou Mφs (1×10^6) incubados com 5μg de mRNA-Hsp65 (contato), células apenas incubadas com meio (mock) ou pulsadas com 50μg da proteína recombinante Hsp65, com um intervalo de 15 dias entre a primeira e a segunda dose. Quinze dias após a segunda dose os pulmões foram coletados para: a) dosagem do homogenato do pulmão, b) determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs) e c) análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar.

4.14.1 - Produção de citocinas do homogenato do pulmão

A dosagem das citocinas IL-12 e IFN-γ diretamente do homogenato do pulmão dos animais infectados com *M. tuberculosis* e tratados com as abordagens terapêuticas não revelaram diferenças significativas quando comparada com o grupo salina (animais infectados e tratados com salina), Figuras 47 e 48.

4.14.2 - Determinação das unidades formadoras de colônia (UFCs)

Não foram encontradas diferenças no número de bactérias presentes no pulmão dos animais infectados e tratados com CDs ou Mφs pulsados com mRNA-Hsp65 ou com a proteína Hsp65 quando comparadas com o grupo controle (animal infectado e tratado com salina), Figura 49.

4.14.3 - Análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar

A análise histológica revela, conforme demonstrado na Figura 50, que os animais infectados e tratados com salina apresentam uma pneumonia tuberculosa com comprometimento parcial do parênquima pulmonar apresentando um intenso infiltrado inflamatório caracterizado pela presença de células mononucleares de localização intra-alveolar associado à presença de BALT (do inglês: bronchus-associated lymphoid tissue, tecido linfóide associado ao brônquio). Notam-se também numerosos macrófagos xantomatosos sugestivos da presença de bacilos. Não parece haver grandes diferenças entre o grupo salina e os demais grupos experimentais. O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal.

As análises morfométricas indicam um comprometimento parcial do tecido pulmonar com cerca de 40% de área de pulmão inflamada, não havendo diferenças entre os diferentes grupos experimentais, Figura 51.

Com base nos parâmetros analisados: produção de citocinas, carga bacilar e análise histológica e morfométrica, pode-se dizer que essa estratégia terapêutica não se mostrou eficiente no tratamento da tuberculose experimental.

Com base nos parâmetros analisados e nos resultados obtidos podemos dizer que as estratégias profilática e terapêutica utilizando 2 dose de APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas coma proteína Hsp65, por via subcutânea, não se mostraram eficientes na proteção e/ou no tratamento da tuberculose experimental.

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Nesse trabalho avaliamos as propriedades profiláticas e terapêuticas de uma nova estratégia vacinal baseada na aplicação de mRNA correspondente ao antígeno Hsp65, no modelo da tuberculose. Para tanto animais foram imunizados com diferentes APCs - linfócitos B (LBs), macrófagos (Mφs) e células dendríticas (CDs) - pulsadas com a proteína ou com a mensagem da Hsp65 de *Mycobacterium leprae* durante a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Nossos resultados revelaram que a vacinação de animais com as APCs pulsadas com a proteína recombinante Hsp65 ou transfectadas com mRNA-Hsp65 e desafiados com a cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv não foi capaz de reduzir a carga bacilar no pulmão dos camundongos infectados. Quando avaliamos as propriedades terapêuticas, ou seja, animais previamente infectados e tratados com as APCs pulsadas com a proteína ou transfectadas com a mensagem, também não observamos redução de UFCs, além disso, os níveis de citocinas no pulmão e comprometimento do tecido pulmonar se mantiveram similares aos encontrados nos animais tratados apenas com salina.

Uma das preocupações iniciais nos protocolos de transfecção de APCs com moléculas de mRNA é a verificação da integridade e meia vida da molécula além da cinética de expressão da proteína correspondente. Embora a molécula de mRNA-Hsp65 produzida *in vitro* apresente certa estabilidade pela adição de análogo de CAP e cauda PoliA, surpreendeu-nos a curta meia vida da molécula após a transfecção de células 293HEK, sendo detectável apenas até 4 horas após a transfecção, por meio de RT-PCR, Figura 4. Além disso, a cinética de expressão da proteína correspondente parece acontecer em níveis baixos e também num período de curta

duração, apenas até 4 horas, Figura 5. Com base nesses dados especulamos que as moléculas de mRNA poderiam estar sendo consumidas ou degradadas por algum mecanismo de controle de expressão da célula. Quanto à curta meia vida da proteína Hsp65 esse fato pode ser uma característica intrínseca da molécula, já que ela apresenta atividade de endopeptidase (Portaro, Hayashi et al. 2002). Dessa forma, a ação enzimática atuando sobre se mesma geraria fragmentos que poderiam ser capazes de induzir uma resposta imune específica, mas dificultaria a detecção da proteína. Outra alternativa a ser considerada, seria a dificuldade inerente de produção de uma proteína procariótica em uma célula eucariótica devido a diferenças de *codon usage*. Dessa forma, a escassez de determinados tRNA para alguns anticódons poderia dificultar a tradução completa da proteína, gerando apenas peptídeos ou proteínas truncadas susceptíveis à degradação (Gustafsson, Govindarajan et al. 2004). De fato a otimização de *codon* em um mRNA de HIV codificando para *gag* induz um grande aumento na produção da proteína (Ngumbela, Ryan et al. 2008).

Embora muitos dos trabalhos com modelos de imunização que abordam a transfecção de células com moléculas de mRNA não apresentem a cinética de expressão de proteínas em células transfectadas, alguns estudos mostram a expressão de proteína verde fluorescente (GFP), corresponde à molécula de mRNA-GFP - como controle da transfecção - de 24 até 48 horas após a transfecção. O fato de termos detectado uma expressão rápida e transiente da proteína Hsp65, produto da tradução das moléculas de mRNA-Hsp65, foi fundamental para determinação do momento de imunização dos animais. Optamos por transferir as APCs transfectadas logo após o processo de eletroporação. Por outro lado, nos experimentos com células pulsadas com mRNA, as APCs foram incubadas por 1 hora e em seguida

injetadas nos animais. Especulamos que nas horas seguintes ao processo de transfecção as APCs estimulariam mais eficientemente os linfócitos T específicos.

A maioria dos protocolos descritos para transfecção de CDs com moléculas de mRNA ou RNA total provenientes de tumores utiliza como ferramenta a eletroporação. Esse método consiste na aplicação de uma carga elétrica que induz uma desestruturação reversível da bicamada lipídica da membrana celular com formação temporária de poros que permitem a entrada de moléculas na célula. Vários estudos já demonstraram que CDs transfectadas por eletroporação são capazes de induzir uma resposta imune específica tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (Bone hill, Herman et al. 2004; Jarnjak-Jankovic, Pettersen et al. 2005; Markovic, Dietz et al. 2006). Entretanto, muito se questiona sobre os efeitos da eletroporação na viabilidade celular e na possibilidade de haver perda das funções fisiológicas ou indução de necrose ou apoptose. Mesmo porque, as CDs apoptóticas ou em necrose são incapazes de induzir uma resposta de células T (Kleindienst and Brocker 2003). Conforme demonstramos para o protocolo adotado nesse trabalho, a viabilidade das células até 1 hora após a eletroporação foi pouca afetada, Tabela II. Além disso, as APCs submetidas à eletroporação e avaliadas quanto ao perfil de moléculas co-estimuladoras 24 horas após a transfecção apresentaram bons índices de viabilidade comparáveis aos índices de viabilidade de células não eletroporadas (dados não mostrados). Em concordância com nossos resultados dados de um estudo atestam a manutenção das propriedades fisiológicas e da viabilidade de CDs submetidas à eletroporação de até 500V (Hilpert, Heiser et al. 2005).

A eficiência da transfecção utilizando a eletroporação quando comparada a outros métodos como uso de lipossomas ou agentes não lipídicos catiônicos já foi abordada em diversos estudos. De uma maneira geral a eletroporação tem sido

considerada um método de transfecção bastante eficiente, superando os resultados obtidos com que a lipotransfecção ou a captura passiva (Kalady, Onaitis et al. 2002; Lundqvist, Noffz et al. 2002; Van Meirvenne, Straetman et al. 2002). Por outro lado, ainda mais eficiente que a eletroporação parece ser a transfecção usando agentes catiônicos não lipídicos como o Transmessenger, inclusive gerando uma melhor resposta protetora (Yu, Babiuk et al. 2007). Nos resultados aqui apresentados a porcentagem de incorporação de moléculas de mRNA-Hsp65 (marcadas com fluorocromo) por APCs eletroporadas foi bastante alta, Figura 7. Contudo, diante da falta de indução de um efeito protetor ou terapêutico não pudemos avaliar possíveis diferenças na eficiência de indução de resposta entre as células eletroporadas ou células pulsadas com mRNA-Hsp65.

Ao contrário do que é mostrado por alguns estudos (Bonehill, Heirman et al. 2004; Markovic, Dietz et al. 2006), em nossas análises, o processo de eletroporação por si só mostrou-se capaz de induzir um aumento de expressão de algumas moléculas co-estimuladoras nas APCs, Figuras 9, 10 e 11. Este dado é bastante interessante, pois em muitos modelos experimentais de imunização com CDs a ativação destas induz uma resposta protetora mais eficiente (Yu, Huang et al. 2006; Carrion, Nieto et al. 2007). Entretanto há também casos nos quais se observa uma resposta protetora mesmo na ausência de estimulação de CDs. Em outros modelos se chama a atenção para o grau de ativação dessas células. Um caso específico relata que a ativação incompleta das CDs em modelo de imunização contra leishmaniose leva a uma resposta indesejada, de perfil Th2, resultando em ausência de proteção (Wiethe, Debus et al. 2008). Um estudo de Boonstra et al também já descreveu que baixas doses de antígeno e o tipo de estimulação aos quais são submetidas as CDs determinam o perfil da resposta (Boonstra, Asselin-Paturel et al.

2003). De fato, estudos com CDs humanas, em ensaios clínicos de vacinação contra diversos tipos de câncer, apontam a necessidade de ativação das células para indução de uma resposta antitumoral eficiente. Nesses ensaios, comumente é utilizado um coquetel de ativação contendo: TNF, IL-1, IL-6 e PgE₂ (Jarnjak-Jankovic, Pettersen et al. 2005; Zobywalski, Javorovic et al. 2007). CDs imaturas além de poderem ser ignoradas pelo sistema imune são capazes de levar a um quadro de tolerância pela indução de células T reguladoras (Treg) produtoras de IL-10 (Jonuleit, Schmitt et al. 2000; Dhodapkar, Steinman et al. 2001). Classicamente já ficou demonstrado que a ativação completa de uma CD requer a sinalização via CD40, e que a falta desse sinal ou uma fraca sinalização, podem levar a uma falha na produção ótima de citocinas. Isso teria implicações diretas na polarização da resposta e na geração de linfócitos T efetores e de memória (Lanzavecchia and Sallusto 2002). A sinalização via CD40 também parece fundamental na imunização com LBs como apresentadores de antígeno. Nesses modelos fica evidente a necessidade de ativação prévia dos LBs com células expressando ligante de CD40 (CD40L) (von Bergwelt-Baildon, Vonderheide et al. 2002; Coughlin, Vance et al. 2004). Curiosamente, dados apresentados recentemente por Fukui et al também revelam que CDs diferenciadas a partir de precursores da medula óssea têm baixa responsividade ao estímulo com agonista de TLR7 (Fukui, Saitoh et al. 2009). Tomando em conta dados obtidos em nosso laboratório, bastante sugestivos da interação entre a molécula de mRNA-Hsp65 e o TLR7, acreditamos que essa interação possa ter se refletido no estado de ativação das APCs e dessa forma possa ter contribuído para a ausência de resposta protetora nos ensaio de profilaxia durante a TB experimental. Especulamos que pelo menos em parte uma ativação

inadequada das APCs em nosso modelo explique a ausência de resposta protetora nos ensaio de profilaxia durante a TB experimental.

O tipo de sinal estimulador que as CDs e possivelmente outras APCs são submetidas pode ser um fator crítico para indução de uma resposta protetora. Em um modelo experimental de leishmaniose CDs pulsadas com antígeno de *Leishmania major* foram ativadas com CPG, TNF- α ou anticorpo anti-CD40, entretanto somente aquelas tratadas com CPG foram capazes de induzir proteção. Adicionalmente foi verificado que o efeito protetor era dependente da produção endógena de IL-12, mas independente da produção de IL-12 pelas CDs transferidas (Ramirez-Pineda, Frohlich et al. 2004). Considerando-se que a proteção contra TB depende invariavelmente da indução de uma forte resposta Th1 podemos pensar que o estado de ativação das APCs, em nosso modelo, possa ter influenciado fortemente os resultados. Mesmo que essas APCs apresentassem um perfil de células ativadas talvez esse não fosse o sinal ideal para indução de uma resposta Th1.

A caracterização fenotípica das diferentes APCs também nos forneceu dados interessantes quanto à capacidade imuno-estimuladora das moléculas de mRNA-Hsp65. Nos M ϕ s e CDs a molécula mRNA-hsp65 parece modular positivamente a expressão de CD40, CD80 e CD86, Figuras 10 e 11. Enquanto nos LBs aumenta a expressão de CD80 e CD86, Figura 9. De fato outros estudos já haviam fornecido evidências da capacidade de moléculas de mRNA em induzirem a ativação de CDs. A transfecção com mRNA de *gag* de HIV induziu a maturação de CDs humanas que foram capazes de gerar uma forte resposta primária *in vitro* (Weissman, Ni et al. 2000). Outro estudo sugeriu que a ativação de CDs por moléculas de mRNA ocorreria provavelmente por uma sinalização mediada por receptores de

nucleotídeos do tipo P2Y (Ni, Capodici et al. 2002). Também já se descreveu a ativação de CDs por moléculas de mRNA de HIV via TLR3 com indução da produção de TNF, IL-1 (Kariko, Ni et al. 2004). Por outro lado, estudos recentes realizados em nosso laboratório indicam que a molécula de mRNA-Hsp65 é capaz de induzir ativação *in vitro* de macrófagos murinos RAW 264.7 e que esta sinalização não se dá via TLR3. Ao contrário, vimos que esse processo é dependente de MyD88 e que se dá provavelmente via TLR7 (manuscrito em elaboração).

As células apresentadoras de antígeno (APCs), sobretudo as CDs, quando pulsadas com a proteína recombinante Hsp65 também modularam positivamente a expressão de algumas moléculas co-estimuladoras. Entretanto, alguns estudos questionam as propriedades imuno-estimuladoras das Hsps. Por se tratarem de chaperonas e por se associarem facilmente a outras moléculas, como o LPS, acredita-se que esse papel imunomodulador seja resultado da ação de moléculas associadas à proteína e não da Hsp propriamente dita (Tsan and Gao 2009). Estudos realizados recentemente em nosso laboratório indicam que realmente pode existir uma contaminação da proteína Hsp65 com LPS, consequente do processo de produção. Entretanto, verificamos que mesmo com a completa neutralização desse contaminante, utilizando polimixina B, ainda existe capacidade estimuladora. A Hsp65 mostrou-se capaz de induzir a ativação de macrófagos murinos RAW 264.7 levando à produção de NO e esse processo ocorreu mesmo na ausência de LPS (manuscrito em elaboração).

Um fato interessante observado durante a realização desse trabalho é que as células recuperadas do baço ou do pulmão dos animais imunizados com as APCs nota-se proliferação celular ou produção de citocinas mesmo na ausência da transfecção com mRNA e do re-estímulo *in vitro* com a proteína Hsp65, Figuras 12,

13 14 e 15. Inicialmente este dado nos causou estranheza, entretanto, alguns trabalhos têm mostrando a capacidade das CDs utilizadas para imunização em induzirem uma ativação de células T específicas contra proteínas do Soro Bovino Fetal (SBF). Ou seja, durante o processo de diferenciação as CDs podem capturar proteínas do meio de cultura e apresentá-las em contexto de MHC ativando linfócitos T específicos contra proteínas do soro (Kadri, Potiron et al. 2007; Rubakova, Petrovskaya et al. 2007). Chama-se atenção para alguns modelos de câncer nos quais as células tumorais crescem *in vitro* na presença de SBF e depois são transferidas para os animais. Nesses casos o efeito citotóxico *in vivo* pode ser consequência da ação de linfócitos T não só contra proteínas tumorais, mas também contra proteínas do soro, constituindo assim um falso resultado. Nesse modelo o cultivo com soro homólogo, no caso camundongo, aboliu o efeito observado. (Toldbod, Agger et al. 2003). Vale comentar que em ensaios de transferência de células em humanos, esse efeito não é observado, pois as células são cultivadas em soro homólogo.

Uma hipótese para explicar nossos resultados negativos pode ser baseada na frequência de células específicas contra a Hsp65 versus aquelas específicas contra proteínas do soro bovino. Uma baixa frequência de linfócitos anti-Hsp65 poderia explicar a ausência de proteção após desafio com Mtb.

As células recuperadas dos animais imunizados e mantidas em cultura podem ser re-estimuladas tanto pela Hsp65 – nos animais que receberam o mRNA-Hsp65 - como pelas proteínas do soro presentes no meio de cultivo. Esse efeito provocado pelas proteínas do soro pode explicar os valores similares na capacidade proliferativa de células recuperadas dos animais imunizados CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 na ausência ou na presença da proteína Hsp65 *in vitro*, Figura 12, como

discutido acima. A mesma tendência pode ser observada para as células do baço recuperadas dos animais imunizados com LBs eletroporados com mRNA-Hsp65, uma vez que este tipo celular também foi mantido em meio de cultura contendo SBF antes de ser injetado nos animais. Esforços recentes têm sido feitos para se tentar abolir esses efeitos do soro heterólogo, nos modelos experimentais, como a tentativa de diferenciação das CDs em meios sem soro ou com 1-2% de soro homólogo. Entretanto a quantidade e a qualidade das CDs geradas por esses processos parecem ser inferiores aos protocolos com soro heterólogo (Lutz and Rossner 2007).

Os resultados de linfoproliferação sugerem que houve expressão da Hsp65 *in vivo* com conseqüente proliferação de células T específicas nos animais imunizados com LB e CDs eletroporados com mRNA-Hsp65, o que não foi observado quando da transferência de Mφs. Apesar de já haver relatos de indução de resposta específica em modelos vacinais de imunização com macrófagos (Gustavson, Zouain et al. 2002) além do fato dessas células apresentarem capacidade de ativação de linfócitos T *naive*, provavelmente, em nosso modelo, as duas principais APCs envolvidas no processo de linfoproliferação, foram os LBs e as CDs.

Nos resultados de dosagem de citocinas, a partir do sobrenadante da cultura de células re-estimuladas *in vitro* com Hsp65 ou BCG, também não pode ser descartado o efeito induzido pelo SBF, isso pode ser evidenciado nos resultados obtidos com as células mock, Figuras 13, 14 e 15. Esse fenômeno também pode ser observado nos experimentos de proteção com células recuperadas do pulmão dos animais vacinados com CDs e infectados, Figuras 17 e 18. Além disso, percebe-se grandes diferenças na produção de citocinas de células recuperadas dos animais imunizados com CDs eletroporadas e CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 em relação aos demais grupos experimentais, especificamente para as citocinas IL-5, IL-

10 e IFN- γ nos experimentos de imunogenicidade e de IL-4 e IFN- γ nos dados de proteção. O fato de LBs e M ϕ s não serem capazes de induzir níveis de produção de citocinas similares ao das CDs talvez seja decorrente de características intrínsecas dessas APCs, nesse modelo vacinal. Esses dados sugerem que dependendo da APC usada na transferência adotiva pode haver modulação da resposta imune, através da produção de citocinas o que certamente pode influenciar na ativação de linfócitos T e no design de estratégias vacinais.

A análise da produção de citocinas induzida pela imunização com CDs tanto nos experimentos de imunogenicidade (Figuras 13, 14 e 15) como de proteção (Figuras 17 e 18) refletem a capacidade desse subtipo de APC de ser potencialmente capaz de indução de um perfil misto de resposta, com altos níveis de IFN- γ , mas também de IL-4, IL-5 e IL-10. Esse fenômeno pode ser implicações diretas na proteção. Essa capacidade de indução de um perfil Th2 pode explicar, pelo menos em parte, a ausência de proteção e de efeitos terapêuticos nos animais imunizados. De fato já foi demonstrado em um modelo de imunização contra infecção por *Chlamydia* que a imunização com CDs pulsadas com a principal proteína de superfície desse parasita induz um perfil de resposta Th2 incapaz de gerar proteção (Shaw, Grund et al. 2002). Esse perfil de resposta induzido por CDs pode estar relacionado ao estado de ativação das células, já que quando as CDs foram incubadas com o próprio microorganismo (*Chlamydia*) observou-se proteção. É possível que em modelos de imunização com CDs pulsadas com o patógeno moléculas presentes na superfície do parasita tenham levado à maturação das CDs induzindo um perfil Th1 protetor (Su, Messer et al. 1998; Shaw, Grund et al. 2001).

Outro fator que parece estar envolvido na determinação do perfil de resposta e consequentemente no sucesso ou fracasso de um modelo vacinal está relacionado com a alogenia das células transferidas. Já se descreveu em um modelo experimental de câncer com imunização com CD alogênicas ou singênicas que somente a transferência de CDs alogênicas é capaz de induzir a redução do tumor, fato esse explicado pela indução de um perfil misto de resposta pelas células singênicas e de perfil Th1 pelas células alogênicas (Suzuki, Fukuhara et al. 2005).

Ainda observando os resultados da imunogenicidade verificamos que nos animais vacinados com as APCs transfectadas não houve detecção de anticorpos específicos anti-Hsp65, Figura 16. Acreditamos que isso tenha ocorrido porque a sequência da Hsp65 codificada pelo mRNA-Hsp65 não contém nenhuma modificação para a secreção, ou seja, a proteína é naturalmente desprovida de peptídeo sinal, o que restringiria sua liberação ao citoplasma da célula transfectada. Especulamos que a proteína codificada pelo mRNA-Hsp65 seja secretada em baixos níveis ou até mesmo não secretada, o que dificultaria uma resposta humoral. Além disso, não podemos descartar a hipótese de que a quantidade antígeno Hsp65 em nosso modelo tenha sido insuficiente para gerar uma resposta humoral, visto que no modelo de vacinação com o antígeno na forma de DNA (DNA-Hsp65) observa-se altos níveis de anticorpos específicos (Goncalves, Bonato et al. 2007; Rosada, de la Torre et al. 2008).

A utilização de CDs transfectadas com mRNA e também com DNA têm sido criticada, porque em teoria preconizaria a ativação de linfócitos T CD8. É de amplo conhecimento que até mesmo em modelos de vacinação contra câncer nos quais seja desejável uma forte resposta de CTLs (linfócitos T citotóxicos), a ativação de LT CD4 se faz necessária para uma resposta mais eficiente e também para geração de

memória. Contudo, o que se vê na prática nos diversos modelos de imunização com DNA ou com CDs transfectadas com mRNA é a estimulação de ambas as populações - CD4 e CD8 - mesmo que a sequência seja desprovida de peptídeo sinal (Pascolo 2004). Entretanto, como possível correção desse problema alguns grupos têm alcançado melhora na resposta de LT CD4 utilizando mRNAs quiméricos com sequências codificadoras de peptídeo sinal ou alguma outra modificação que favoreça o processamento do antígeno via MHC-II (Van Meirvenne, Straetman et al. 2002; Bonehill, Heirman et al. 2003; Su, Dannull et al. 2005).

Não nos surpreenderia que a imunização com APCs transfectadas com mRNA produzisse efeitos diferentes da imunização com células pulsadas com proteína, já que na primeiras seria favorecida a ativação de LT CD88 e na outra LT CD4. Contudo não consideramos que isso fosse um problema já que em outros modelos experimentais de TB tanto as estratégias favorecendo a ativação de células CD4 como CD8 foram capazes de induzir proteção (Doi, Yamada et al. 2007; Rubakova, Petrovskaya et al. 2007). Além disso, a apresentação de antígeno via *cross-priming* pode levar a ativação de ambas as classes de linfócitos T.

Nos ensaios iniciais de proteção com APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 apesar de não ter sido detectado um efeito protetor a imunização sobretudo com CDs revelou aspectos interessantes. O fato de poder haver estimulação de diversos clones de linfócitos T com perfil tanto Th1 como Th2, talvez possa explicar o padrão misto da resposta, no grupo de CDs. De fato já foi descrito que o padrão de produção de citocinas em modelos que usam CDs para vacinação tende a ser bastante complexo e pode não obedecer à dicotomia clássica Th1/Th2, mesmo quando as células são cultivadas em soro autólogo, ou seja, quando se descarta a influência das proteínas do SBF (Bullens, Kasran et al. 2001; Gor, Rose et al. 2003; Chaouat,

Ledee-Bataille et al. 2004). Também existe a possibilidade de que moléculas co-estimuladoras e citocinas produzidas pelas CDs induzam ativação inespecífica de linfócitos T (Mu, Gaudernack et al. 2003; Kyte, Kvalheim et al. 2005; Kyte, Kvalheim et al. 2007). No entanto, não podemos descartar em nosso modelo o efeito do SBF na estimulação das células recuperadas dos animais vacinados, sendo assim, ainda existe a possibilidade de que os efeitos observados *in vitro* não reproduzam o que ocorra *in vivo*. Além disso, já foi descrito que CDs apenas cultivadas na presença de SFB podem exercer efeito imuno-estimulador protetor ainda que este seja inespecífico (Kadri, Potiron et al. 2007). Para tentar descartar a influência efeito do SBF na re-estimulação *in vitro* nos seguintes experimentos fizemos a dosagem de citocinas diretamente do homogenato do pulmão dos animais vacinados e desafiados e também nos experimentos de terapia com animais infectados e tratados. De fato esse efeito parece ter sido eliminado, já que não foram mais detectadas grandes diferenças entre os animais imunizados com APCs e o grupo controle (animal vacinado ou tratado com salina e infectado com Mtb).

Diante dos dados apresentados especulamos que a falta de efeitos profiláticos pode ter sido o resultado de vários fatores que incluem principalmente a produção insuficiente de antígeno incapaz de sustentar uma resposta protetora consistente e também o estado de ativação das APCs incapaz de induzir uma forte resposta de perfil Th1 protetor.

Na análise dos resultados dos experimentos de terapia além dos fatores que já foram discutidos para profilaxia tem que se considerar também a infecção presente nos animais antes da injeção das células. O possível efeito terapêutico induzido pelas células transfectadas com mRNA ou pulsadas com a proteína transferidas para um animal com uma tuberculose ativa poderia ser alterado. Já foi descrito que as

CDs endógenas têm um papel importante na expansão e na indução de uma resposta ótima nos modelos de vacinação com CDs. Interações do tipo célula-célula ocorrendo nos linfonodos drenantes entre as CDs transferidas e as endógenas garantem a expansão ótima dos linfócitos T (Kleindienst and Brocker 2003). Entretanto, durante a infecção pelo Mtb a capacidade de ativar linfócitos T das CDs endógenas do pulmão e dos linfonodos drenantes é prejudicada devido à inibição da apresentação de antígeno via MHC-II (Wolf, Linhas et al. 2007). Diante desses fatos pode-se especular que um efeito terapêutico mediado pela transferência de CDs nos animais com TB seja dificultado.

Outro fator que poderia interferir nos ensaios de terapia e nesse caso seria um componente positivo é o fato de que durante uma infecção os linfócitos T de memória efetora migram para os linfonodos drenantes e interagem com as CDs endógenas ativando-as via interação CD40-CD40L - CD40 nas CDs com CD40L nos linfócitos (Martin-Fontecha, Baumjohann et al. 2008). Considerando que as CDs transferidas também podem migrar para os linfonodos, a interação com os linfócitos T poderia favorecer a maturação dessas células, tornando-as aptas a ativar linfócitos T *naive*.

Nos últimos anos muitos grupos têm alcançado efeitos terapêuticos contra TB por meio da manipulação da resposta imune. Na grande maioria dos trabalhos destacam-se alguns componentes comuns que estão diretamente ligados ao efeito imunoterapêutico, como a indução de uma resposta citotóxica mediada por CTLs, células NK, NKT e $T\gamma\delta$ além de uma regulação negativa da produção de IL-4 e TGF- β (Rook, Lowrie et al. 2007). De fato o tratamento de camundongos infectados por via intravenosa com Mtb com a vacina DNA-Hsp65 induziu um aumento da resposta de LT CD8 e diminuição da produção de IL-4 com redução significativa da carga bacilar (Lowrie, Tascon et al. 1999). Mais recentemente um estudo de análise de perfil de

expressão gênica em animais infectados com Mtb e tratados com DNA-Hsp65 sugere fortemente que além de induzir uma resposta Th1 a vacinação também inibe a resposta Th2 (Zarate-Blades, Bonato et al. 2009). Efeito semelhante de inibição da resposta Th2 foi observado em animais infectados e tratados por via subcutânea com *M. vaccae* inativado (Hernandez-Pando, Pavon et al. 2000). Contudo a análise de produção de citocinas em nossos estudos não revelou diferenças entre os animais apenas infectados e os infectados e tratados com as APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65. O fato das citocinas serem dosadas diretamente do homogenato pulmonar, para evitar a interferência do SBF, já relatado anteriormente, tornou difícil ou até mesmo inviável a dosagem de algumas citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 características de uma resposta Th2. Considerando a existência de uma forte resposta imune induzida pela infecção com Mtb com um componente predominantemente Th1 nas fases iniciais da doença, acreditamos que o uso de técnicas mais específicas e sensíveis, tais como ELISPOT seria uma ferramenta mais adequada para essa análise, tanto para a profilaxia como para a imunogenicidade. A avaliação da resposta específica anti-Hsp65 poderia esclarecer o mecanismo de resposta induzido pela estratégia vacinal.

Em modelos de vacina de DNA já foi demonstrado que tanto a forma do antígeno - citoplasmático, solúvel, secretado - como a quantidade são importantes para geração de uma resposta protetora. Para a população de LT CD8 acredita-se que mesmo baixas concentrações de antígeno sejam capazes de gerar resposta efetora e de memória (Kaech and Ahmed 2001). Por outro lado, os LT CD4 parecem precisar de repetidas exposições ao antígeno para sobreviverem, proliferarem e também para se diferenciarem em células efetoras produtoras de citocinas (Bajenoff, Wurtz et al. 2002). Acreditamos que um dos pontos essenciais no fato de não termos

observado efeitos profiláticos e terapêuticos com nenhuma das APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65 tenha sido a quantidade insuficiente de antígeno. O mesmo imunógeno (Hsp65) usado em uma abordagem de vacina de DNA já havia se mostrado competente no tratamento da TB experimental (Lowrie, Tascon et al. 1999). Vale ressaltar que nesse modelo a infecção se fez por via endovenosa, ao contrário da nossa abordagem que utilizou um modelo de infecção por via intranasal. Assim é difícil estabelecer uma comparação entre esses dois modelos de TB experimental. Por outro lado, já havia sido demonstrado o efeito protetor da vacina DNA-Hsp65 em modelo de infecção intratraqueal com Mtb (de Paula, Silva et al. 2007). É importante enfatizar que nesse modelo de vacinação com DNA-Hsp65 a mensagem para a proteína pode ser detectada até 15 dias após a imunização o que implica necessariamente em uma expressão prolongada do antígeno (Coelho-Castelo, Trombone et al. 2006; Trombone, Silva et al. 2007). Em nosso modelo com APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 observamos uma expressão rápida e transiente com detecção de mensagem apenas até 4 horas após a transfecção. Da mesma forma as APCs pulsadas com a proteína também podem ser consideradas como uma fonte limitada de fornecimento de antígeno. Acreditamos que essa diferença na disponibilidade da Hsp65 tenha sido fundamental para não geração de efeito protetor ou terapêutico.

Outro fator que talvez esteja envolvido com o não funcionamento da estratégia com células transfectadas com mRNA e na disponibilidade de antígeno possa ser o método de transfecção. Tal hipótese pode ser sustentada pelos dados obtidos da imunização com mRNA-Hsp65 livre de formulações. Nesse modelo, a vacinação intranasal levou a proteção contra infecção com Mtb (Lorenzi et al, manuscrito em preparação). Embora diversos trabalhos descrevam a eletroporação como meio de

transfecção eficiente, em um trabalho recente fazendo diversas comparações entre métodos de transfecção de células com mRNA observou-se que embora a eletroporação favoreça a entrada das moléculas nas células o nível de tradução do mRNA é baixo (Yu, Babiuk et al. 2007). Já a transfecção de células apenas por incubação com as moléculas de mRNA nuas, que também foi utilizada em alguns dos nossos protocolos, apresenta resultados um tanto diversos que vão desde a não detecção da proteína (Van Tendeloo, Ponsaerts et al. 2001) até a indução de uma resposta protetora específica (Heiser, Maurice et al. 2001).

Outro aspecto importante em modelos vacinais e que pode ser determinante para o sucesso da estratégia profilática ou terapêutica é a escolha da rota de administração. Especificadamente para as vacinas usando a transferência de CDs transfectadas ou pulsadas com proteína ou peptídeos ainda existem dúvidas quanto à melhor rota de imunização. Nos modelos de vacinas contra tumores podem ser usadas as rotas intravenosa (i.v), intradérmica (i.d) ou subcutânea (s.c), (Weide, Garbe et al. 2008). Não parece existir uma regra e para cada modelo experimental pode se optar por uma via em detrimento a outras. Já foi demonstrado que a imunização com CDs por via intravenosa parece favorecer a migração das células inicialmente para o pulmão com posterior acúmulo no baço. Por outro lado as imunizações intradérmicas tendem a favorecer a migração das CDs para os linfonodos drenantes na região de acúmulo de células T (Eggert, Schreurs et al. 1999). Em nosso trabalho verificamos a eficiência de duas vias de imunização: intravenosa (i.v) e subcutânea (s.c). Embora não tenhamos verificado diferenças de eficiência entre as duas vias, a resposta para definição da melhor rota nesse modelo experimental de TB só poderia ser determinada com a exclusão de outros fatores como a quantidade de antígeno e o estado de ativação das APCs.

A estratégia de induzir proteção pela transferência de CDs pulsadas com proteínas ou peptídeos de Mtb já havia sido descrita em alguns modelos experimentais com resultados um pouco distintos. Dois trabalhos mostraram a capacidade protetora de CDs infectadas com BCG ou com *Mycobacterium tuberculosis*. Nesses modelos fica evidente a capacidade dos patógenos de promover a maturação das CDs e sua importância na proteção. Além disso, o efeito alcançado está ligado à indução de uma forte resposta de células T com produção de IFN- γ (Demangel, Bean et al. 1999; Tascon, Soares et al. 2000). Entretanto, variabilidades entre esses modelos tanto no modo de infecção bem como na via de imunização tornam difícil estabelecer claramente os parâmetros ideais que levaram à proteção. Estudos realizados por outros grupos também conseguiram obter algum nível de proteção quando CDs foram pulsadas com peptídeos de Mtb e mais uma vez os resultados foram bastante variáveis quanto à necessidade de maturação das CDs, número de doses, quantidade de células transferidas e rota de imunização (Dow, Roberts et al. 2000; McShane, Behboudi et al. 2002; Doi, Yamada et al. 2007). Também já foram descritos casos em que a imunização com CDs foi incapaz de induzir proteção. Um estudo de Rubakova et al além de mostrar a interferência do SBF nos ensaios de imunogenicidade, assim como descrevemos em nosso trabalho, também verificou a falta de proteção quando a rota de imunização foi a via intravenosa. Já a imunização com 3 doses por via subcutânea foi capaz de reduzir a carga bacilar e uma melhorar a histopatologia do pulmão (Rubakova, Petrovskaya et al. 2007). Por outro lado, também já se observou ausência de proteção com agravamento da inflamação no pulmão quando CDs pulsadas com Ag85 de Mtb foram utilizadas em um modelo de vacinação com imunização intranasal (Gonzalez-Juarrero, Turner et al. 2002). O que parece estar claro nesses estudos é que mesmo

que exista uma resposta específica de linfócitos T com a produção de IFN- γ nem sempre esta é suficiente para induzir proteção. Fatores que vão desde a escolha do imunógeno até o estado de maturação das CDs, passando pela via de administração, número de doses e quantidade de células parecem influenciar os resultados.

Os dados aqui obtidos refletem primeiramente a dificuldade inerente de se induzir proteção contra o Mtb e abrem questionamentos quanto à determinação dos parâmetros ideais capazes de gerar uma resposta efetiva não só contra TB, mas também contra outras doenças infecciosas, em modelos de imunização com APCs, particularmente com CDs. A escolha de um antígeno ou antígenos com fortes propriedades imunogênicas, as quantidades desse antígeno e a forma como ele é ministrado, bem como as vias de imunização e até mesmo o estado de maturação das APCs podem ser decisivos para o sucesso de um modelo experimental de imunização.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

- As moléculas de mRNA-Hsp65 geradas *in vitro* a partir do plasmídeo pcDNA3A-Hsp65 apresentavam-se íntegras antes do processo de transfecção e puderam ser traduzidas em proteína. Apesar dessa estabilidade tanto a mensagem quanto a proteína só puderam ser detectadas em células transfectadas até 4 horas após o processo de transfecção indicando um rápido processo de produção de proteína e consequentemente de uma escassa disponibilidade de antígeno;
- O processo de eletroporação mostrou-se eficiente como forma de incorporação de moléculas de mRNA-Hsp65 pelas APCs, além disso as células submetidas a esse método de transfecção apresentaram bons índices de viabilidade;
- A fenotipagem das células eletroporadas ou pulsadas com mRNA-Hsp65 e pulsadas com a proteína Hsp65 indicou que CDs e Mφs aumentaram a expressão de algumas moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86 sugerindo que as moléculas de mRNA e de proteína Hsp65 apresentam alguma atividade estimuladora. Além disso, o próprio processo de eletroporação foi capaz de induzir uma alteração no perfil de moléculas de superfície. Os linfócitos B submetidos aos mesmos tratamentos que as outras APCs tiveram poucas alterações no perfil de expressão de moléculas de superfície sugerindo um fenótipo mais próximo de célula apresentadora imatura;
- Os ensaios de imunogenicidade mostraram que a capacidade proliferativa de células recuperadas dos animais vacinados e re-estimuladas *in vitro* com Hsp65 foi significativamente maior do que a observada nos animais imunizados com salina, nos grupos: LBs eletroporados com mRNA-Hsp65, CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65. A dosagem de citocinas revelou que células provenientes do baço de animais

imunizados com CDs mock ou CDs eletroporadas com mRNA-Hsp65 foram capazes de induzir um perfil misto de resposta com produção de IFN- γ mas também de IL-5 e IL-10. Por outro lado, as células recuperadas de LBs e M ϕ eletroporados com mRNA-Hsp65 produziram um perfil Th2. Notamos que nos grupos imunizados com APCs ocorreu proliferação celular e produção de citocinas mesmo na ausência do re-estímulo *in vitro* com a proteína Hsp65. Além disso, nenhuma das imunizações com APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 foi capaz de induzir uma resposta humoral específica;

- A vacinação com APCs transfectadas com mRNA-Hsp65 ou pulsadas com a proteína Hsp65, por via intravenosa ou subcutânea, antes ou depois da infecção pelo Mtb, não induziu alteração do nível de citocinas no pulmão, não foi capaz de reduzir o número de bactérias e também não preservou o parênquima pulmonar após a infecção com o Mtb. Portanto essa estratégia vacinal foi incapaz de gerar proteção ou efeito terapêutico contra a tuberculose experimental;

- De uma maneira geral, diferentemente de quando o antígeno Hsp65 é apresentado na forma de vacina de DNA, conforme já demonstrado em diversos trabalhos realizados pelo Núcleo de Pesquisas em Tuberculose, no modelo vacinal descrito nesse trabalho, que se baseia no uso da proteína ou da mensagem da Hsp65 carregadas por APCs, o antígeno parece perder a capacidade de induzir uma resposta protetora ou terapêutica. A partir desses dados, concluímos que pelo menos em parte, os efeitos produzidos pela Hsp65 dependem da persistência do antígeno por períodos de tempo mais longos, como ocorre quando este é administrado na forma de DNA plasmideal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulhaqq, S. A. and D. B. Weiner (2008). "DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses." Immunol Res **42**(1-3): 219-32.
- Absher, M. and W. R. Stinebring (1969). "Toxic properties of a synthetic double-stranded RNA. Endotoxin-like properties of poly I. poly C, an interferon stimulator." Nature **223**(5207): 715-7.
- Akbari, O., N. Panjwani, et al. (1999). "DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity." J Exp Med **189**(1): 169-78.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.
- Aline, F., D. Brand, et al. (2007). "Generation of specific Th1 and CD8+ T-cell responses by immunization with mouse CD8+ dendritic cells loaded with HIV-1 viral lysate or envelope glycoproteins." Microbes Infect **9**(4): 536-43.
- Askew, D., R. S. Chu, et al. (2000). "CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms." J Immunol **165**(12): 6889-95.
- Bacci, A., C. Montagnoli, et al. (2002). "Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation." J Immunol **168**(6): 2904-13.
- Bajenoff, M., O. Wurtz, et al. (2002). "Repeated antigen exposure is necessary for the differentiation, but not the initial proliferation, of naive CD4(+) T cells." J Immunol **168**(4): 1723-9.
- Boczkowski, D., S. K. Nair, et al. (1996). "Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo." J Exp Med **184**(2): 465-72.
- Bodles-Brakhop, A. M. and R. Draghia-Akli (2008). "DNA vaccination and gene therapy: optimization and delivery for cancer therapy." Expert Rev Vaccines **7**(7): 1085-101.
- Bonato, V. L., V. M. Lima, et al. (1998). "Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice." Infect Immun **66**(1): 169-75.
- Bonehill, A., C. Heirman, et al. (2004). "Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules." J Immunol **172**(11): 6649-57.
- Bonehill, A., C. Heirman, et al. (2003). "Efficient presentation of known HLA class II-restricted MAGE-A3 epitopes by dendritic cells electroporated with messenger RNA encoding an invariant chain with genetic exchange of class II-associated invariant chain peptide." Cancer Res **63**(17): 5587-94.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, et al. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197**(1): 101-9.
- Bosio, C. M., D. Gardner, et al. (2000). "Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology." J Immunol **164**(12): 6417-25.
- Brewer, T. F., S. J. Heymann, et al. (2001). "Strategies to decrease tuberculosis in us homeless populations: a computer simulation model." Jama **286**(7): 834-42.

- Brodsky, I., D. R. Strayer, et al. (1985). "Clinical studies with ampligen (mismatched double-stranded RNA)." J Biol Response Mod **4**(6): 669-75.
- Bryant, P. W., A. M. Lennon-Dumenil, et al. (2002). "Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules." Adv Immunol **80**: 71-114.
- Bullens, D. M., A. Kasran, et al. (2001). "CD40L-induced IL-12 production is further enhanced by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13." Scand J Immunol **53**(5): 455-63.
- Cai, H., X. Tian, et al. (2004). "Combined DNA vaccines formulated in DDA enhance protective immunity against tuberculosis." DNA Cell Biol **23**(7): 450-6.
- Carralot, J. P., J. Probst, et al. (2004). "Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines." Cell Mol Life Sci **61**(18): 2418-24.
- Carrion, J., A. Nieto, et al. (2007). "Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with Leishmania infantum nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice." Microbes Infect **9**(6): 735-43.
- Carter, W. A., D. R. Strayer, et al. (1987). "Clinical, immunological, and virological effects of ampligen, a mismatched double-stranded RNA, in patients with AIDS or AIDS-related complex." Lancet **1**(8545): 1286-92.
- Carter, W. A., D. R. Strayer, et al. (1985). "Preclinical studies with Ampligen (mismatched double-stranded RNA)." J Biol Response Mod **4**(5): 495-502.
- Cella, M., A. Engering, et al. (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." Nature **388**(6644): 782-7.
- Ceppi, M., N. Ruggli, et al. (2005). "Double-stranded secondary structures on mRNA induce type I interferon (IFN alpha/beta) production and maturation of mRNA-transfected monocyte-derived dendritic cells." J Gene Med **7**(4): 452-65.
- Chan, E. D. and M. D. Iseman (2008). "Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review." Curr Opin Infect Dis **21**(6): 587-95.
- Changhong, S., Z. Hai, et al. (2009). "Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of Mycobacterium tuberculosis and the human interleukin 2 fusion gene." Tuberculosis (Edinb) **89**(1): 54-61.
- Chaouat, G., N. Ledee-Bataille, et al. (2004). "TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm." Int Arch Allergy Immunol **134**(2): 93-119.
- Chattergoon, M. A., T. M. Robinson, et al. (1998). "Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells." J Immunol **160**(12): 5707-18.
- Cheng, W. F., C. H. Hung, et al. (2001). "Enhancement of sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of herpes simplex virus type 1 VP22 protein to antigen." J Virol **75**(5): 2368-76.
- Cho, H. I., E. K. Kim, et al. (2007). "Enhanced induction of anti-tumor immunity in human and mouse by dendritic cells pulsed with recombinant TAT fused human survivin protein." Cancer Lett **258**(2): 189-98.
- Coelho-Castelo, A. A., R. R. Santos Junior, et al. (2003). "B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery." Hum Gene Ther **14**(13): 1279-85.
- Coelho-Castelo, A. A., A. P. Trombone, et al. (2006). "Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery." Genet Vaccines Ther **4**: 1.

- Connolly, N. C., T. L. Whiteside, et al. (2008). "Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals." Clin Vaccine Immunol **15**(2): 284-92.
- Constant, S. L. (1999). "B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4+ T cell priming in vivo." J Immunol **162**(10): 5695-703.
- Coughlin, C. M., B. A. Vance, et al. (2004). "RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy." Blood **103**(6): 2046-54.
- de Paula, L., C. L. Silva, et al. (2007). "Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs." Genet Vaccines Ther **5**: 2.
- Demangel, C., A. G. Bean, et al. (1999). "Protection against aerosol Mycobacterium tuberculosis infection using Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin-infected dendritic cells." Eur J Immunol **29**(6): 1972-9.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." Science **303**(5663): 1529-31.
- Doi, T., H. Yamada, et al. (2007). "H2-M3-restricted CD8+ T cells induced by peptide-pulsed dendritic cells confer protection against Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **178**(6): 3806-13.
- Dow, S. W., A. Roberts, et al. (2000). "Immunization with f-Met peptides induces immune reactivity against Mycobacterium tuberculosis." Tuber Lung Dis **80**(1): 5-13.
- Eggert, A. A., M. W. Schreurs, et al. (1999). "Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration." Cancer Res **59**(14): 3340-5.
- Encke, J., J. Findelee, et al. (2005). "Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection." Clin Exp Immunol **142**(2): 362-9.
- Fine, P. E. (1998). "Vaccines, genes and trials." Novartis Found Symp **217**: 57-69; discussion 69-72.
- Fine, P. E. and E. Vynnycky (1998). "The effect of heterologous immunity upon the apparent efficacy of (e.g. BCG) vaccines." Vaccine **16**(20): 1923-8.
- Flynn, J. L. and J. Chan (2005). "What's good for the host is good for the bug." Trends Microbiol **13**(3): 98-102.
- Fukui, R., S. Saitoh, et al. (2009). "Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing." J Exp Med **206**(6): 1339-50.
- Gerloni, M., M. Rizzi, et al. (2004). "T cell immunity using transgenic B lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3892-7.
- Gilkeson, G. S., A. M. Pippen, et al. (1995). "Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA." J Clin Invest **95**(3): 1398-402.
- Goncalves, E. D., V. L. Bonato, et al. (2007). "Improve protective efficacy of a TB DNA-HSP65 vaccine by BCG priming." Genet Vaccines Ther **5**: 7.

- Gonzalez-Juarrero, M., J. Turner, et al. (2002). "Florid pulmonary inflammatory responses in mice vaccinated with Antigen-85 pulsed dendritic cells and challenged by aerosol with Mycobacterium tuberculosis." Cell Immunol **220**(1): 13-9.
- Gor, D. O., N. R. Rose, et al. (2003). "TH1-TH2: a procrustean paradigm." Nat Immunol **4**(6): 503-5.
- Granstein, R. D., W. Ding, et al. (2000). "Induction of anti-tumor immunity with epidermal cells pulsed with tumor-derived RNA or intradermal administration of RNA." J Invest Dermatol **114**(4): 632-6.
- Gupta, U. D., V. M. Katoch, et al. (2007). "Current status of TB vaccines." Vaccine **25**(19): 3742-51.
- Gurunathan, S., D. M. Klinman, et al. (2000). "DNA vaccines: immunology, application, and optimization*." Annu Rev Immunol **18**: 927-74.
- Gustafsson, C., S. Govindarajan, et al. (2004). "Codon bias and heterologous protein expression." Trends Biotechnol **22**(7): 346-53.
- Gustavson, S., C. S. Zouain, et al. (2002). "Modulation of granulomatous hypersensitivity against Schistosoma mansoni eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII." Parasitol Int **51**(3): 259-69.
- Haile, M. and G. Kallenius (2005). "Recent developments in tuberculosis vaccines." Curr Opin Infect Dis **18**(3): 211-5.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-9.
- Heiser, A., M. A. Maurice, et al. (2001). "Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors." Cancer Res **61**(8): 3388-93.
- Hernandez-Pando, R., L. Pavon, et al. (2000). "Interactions between hormone-mediated and vaccine-mediated immunotherapy for pulmonary tuberculosis in BALB/c mice." Immunology **100**(3): 391-8.
- Herrmann, J. L. and P. H. Lagrange (2005). "Dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis: which is the Trojan horse?" Pathol Biol (Paris) **53**(1): 35-40.
- Hestvik, A. L., Z. Hmama, et al. (2005). "Mycobacterial manipulation of the host cell." FEMS Microbiol Rev **29**(5): 1041-50.
- Hilpert, F., A. Heiser, et al. (2005). "The impact of electrical charge on the viability and physiology of dendritic cells." Scand J Immunol **62**(4): 399-406.
- Hoerr, I., R. Obst, et al. (2000). "In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies." Eur J Immunol **30**(1): 1-7.
- Jarnjak-Jankovic, S., R. D. Pettersen, et al. (2005). "Evaluation of dendritic cells loaded with apoptotic cancer cells or expressing tumour mRNA as potential cancer vaccines against leukemia." BMC Cancer **5**: 20.
- Johnson, C. M., A. M. Cooper, et al. (1997). "Mycobacterium tuberculosis aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice." Tuber Lung Dis **78**(5-6): 257-61.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-22.
- Kadri, N., N. Potiron, et al. (2007). "Fetal calf serum-primed dendritic cells induce a strong anti-fetal calf serum immune response and diabetes protection in the non-obese diabetic mouse." Immunol Lett **108**(2): 129-36.

- Kaech, S. M. and R. Ahmed (2001). "Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells." Nat Immunol **2**(5): 415-22.
- Kalady, M. F., M. W. Onaitis, et al. (2002). "Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy." J Surg Res **105**(1): 17-24.
- Kamath, A. T., C. G. Feng, et al. (1999). "Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **67**(4): 1702-7.
- Kariko, K., H. Ni, et al. (2004). "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3." J Biol Chem **279**(13): 12542-50.
- Kim, H. S., Y. S. Choo, et al. (2006). "Enhancement of antitumor immunity of dendritic cells pulsed with heat-treated tumor lysate in murine pancreatic cancer." Immunol Lett **103**(2): 142-8.
- Kleindienst, P. and T. Brocker (2003). "Endogenous dendritic cells are required for amplification of T cell responses induced by dendritic cell vaccines in vivo." J Immunol **170**(6): 2817-23.
- Kleindienst, P. and T. Brocker (2005). "Concerted antigen presentation by dendritic cells and B cells is necessary for optimal CD4 T-cell immunity in vivo." Immunology **115**(4): 556-64.
- Klinman, D. M., M. Takeno, et al. (1997). "DNA vaccines: safety and efficacy issues." Springer Semin Immunopathol **19**(2): 245-56.
- Kofler, R. M., J. H. Aberle, et al. (2004). "Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 1951-6.
- Kondo, E., M. S. Topp, et al. (2002). "Efficient generation of antigen-specific cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40-activated B cells." J Immunol **169**(4): 2164-71.
- Kyte, J. A., G. Kvalheim, et al. (2005). "Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination." Cancer Gene Ther **12**(6): 579-91.
- Kyte, J. A., G. Kvalheim, et al. (2007). "T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells." Cancer Immunol Immunother **56**(5): 659-75.
- Langlade-Demoyen, P., F. Garcia-Pons, et al. (2003). "Role of T cell help and endoplasmic reticulum targeting in protective CTL response against influenza virus." Eur J Immunol **33**(3): 720-8.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2002). "Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response." Nat Rev Immunol **2**(12): 982-7.
- Lima, K. M., S. A. Santos, et al. (2003). "Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis." Gene Ther **10**(8): 678-85.
- Linton, P. J., J. Harbertson, et al. (2000). "A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells." J Immunol **165**(10): 5558-65.
- Liu, M. A. and J. B. Ulmer (2005). "Human clinical trials of plasmid DNA vaccines." Adv Genet **55**: 25-40.
- Liu, Y., Y. Wu, et al. (1995). "Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 T cell response." Int Immunol **7**(8): 1353-62.
- Lowrie, D. B., R. E. Tascon, et al. (1999). "Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination." Nature **400**(6741): 269-71.

- Lowrie, D. B., R. E. Tascon, et al. (1994). "Towards a DNA vaccine against tuberculosis." Vaccine **12**(16): 1537-40.
- Lu, W., L. C. Arraes, et al. (2004). "Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection." Nat Med **10**(12): 1359-65.
- Lundqvist, A., G. Noffz, et al. (2002). "Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection." J Immunother **25**(6): 445-54.
- Lutz, M. B. and S. Rossner (2007). "Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum." Immunobiology **212**(9-10): 855-62.
- Maglione, P. J. and J. Chan (2009). "How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis." Eur J Immunol **39**(3): 676-86.
- Maglione, P. J., J. Xu, et al. (2007). "B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **178**(11): 7222-34.
- Markovic, S. N., A. B. Dietz, et al. (2006). "Preparing clinical-grade myeloid dendritic cells by electroporation-mediated transfection of in vitro amplified tumor-derived mRNA and safety testing in stage IV malignant melanoma." J Transl Med **4**: 35.
- Martin-Fontecha, A., D. Baumjohann, et al. (2008). "CD40L+ CD4+ memory T cells migrate in a CD62P-dependent fashion into reactive lymph nodes and license dendritic cells for T cell priming." J Exp Med **205**(11): 2561-74.
- Martinon, F., S. Krishnan, et al. (1993). "Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA." Eur J Immunol **23**(7): 1719-22.
- McShane, H., S. Behboudi, et al. (2002). "Protective immunity against Mycobacterium tuberculosis induced by dendritic cells pulsed with both CD8(+)- and CD4(+)-T-cell epitopes from antigen 85A." Infect Immun **70**(3): 1623-6.
- Minion, F. C., S. A. Menon, et al. (2003). "Enhanced murine antigen-specific gamma interferon and immunoglobulin G2a responses by using mycobacterial ESAT-6 sequences in DNA vaccines." Infect Immun **71**(4): 2239-43.
- Mu, L. J., G. Gaudernack, et al. (2003). "A protocol for generation of clinical grade mRNA-transfected monocyte-derived dendritic cells for cancer vaccines." Scand J Immunol **58**(5): 578-86.
- Nair, S., D. Boczkowski, et al. (2003). "Synergy between tumor immunotherapy and antiangiogenic therapy." Blood **102**(3): 964-71.
- Ngumbela, K. C., K. P. Ryan, et al. (2008). "Quantitative effect of suboptimal codon usage on translational efficiency of mRNA encoding HIV-1 gag in intact T cells." PLoS ONE **3**(6): e2356.
- Nguyen, L. and J. Pieters (2005). "The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages." Trends Cell Biol **15**(5): 269-76.
- Ni, H., J. Capodici, et al. (2002). "Extracellular mRNA induces dendritic cell activation by stimulating tumor necrosis factor-alpha secretion and signaling through a nucleotide receptor." J Biol Chem **277**(15): 12689-96.
- Ni, X., H. M. Richmond, et al. (2008). "Induction of T-cell responses against cutaneous T-cell lymphomas ex vivo by autologous dendritic cells transfected with amplified tumor mRNA." J Invest Dermatol **128**(11): 2631-9.
- Norbury, C. C., B. J. Chambers, et al. (1997). "Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of

- exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells." Eur J Immunol **27**(1): 280-8.
- Osman, Y., M. Narita, et al. (2003). "Generation of Ag-specific cytotoxic T lymphocytes by DC transfected with in vitro transcribed influenza virus matrix protein (M1) mRNA." Cytotherapy **5**(2): 161-8.
- Paglia, P., C. Chiodoni, et al. (1996). "Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo." J Exp Med **183**(1): 317-22.
- Pan, Y., H. Cai, et al. (2003). "[Combined recombinant DNA vaccine results in significant protection against Mycobacterium tuberculosis]." Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) **35**(1): 71-6.
- Pascolo, S. (2004). "Messenger RNA-based vaccines." Expert Opin Biol Ther **4**(8): 1285-94.
- Pierce, S. K., J. F. Morris, et al. (1988). "Antigen-presenting function of B lymphocytes." Immunol Rev **106**: 149-80.
- Pimm, M. V., M. J. Embleton, et al. (1976). "Treatment of transplanted rat tumours with double-stranded RNA (BRL 5907). I. Influenced of systemic and local administration." Br J Cancer **33**(2): 154-65.
- Porgador, A. and E. Gilboa (1995). "Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **182**(1): 255-60.
- Porgador, A., D. Snyder, et al. (1996). "Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells." J Immunol **156**(8): 2918-26.
- Portaro, F. C., M. A. Hayashi, et al. (2002). "The Mycobacterium leprae hsp65 displays proteolytic activity. Mutagenesis studies indicate that the M. leprae hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HslVU protease." Biochemistry **41**(23): 7400-6.
- Pozzi, L. A., J. W. Maciaszek, et al. (2005). "Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells." J Immunol **175**(4): 2071-81.
- Qiu, P., P. Ziegelhoffer, et al. (1996). "Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization." Gene Ther **3**(3): 262-8.
- Ramirez-Pineda, J. R., A. Frohlich, et al. (2004). "Dendritic cells (DC) activated by CpG DNA ex vivo are potent inducers of host resistance to an intracellular pathogen that is independent of IL-12 derived from the immunizing DC." J Immunol **172**(10): 6281-9.
- Reece, S. T. and S. H. Kaufmann (2008). "Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology." Int J Med Microbiol **298**(1-2): 143-50.
- Remer, K. A., C. Apetrei, et al. (2007). "Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with Leishmania major in mice." Eur J Immunol **37**(9): 2463-73.
- Rock, K. L., I. A. York, et al. (2002). "Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides." Adv Immunol **80**: 1-70.
- Ronchese, F. and B. Hausmann (1993). "B lymphocytes in vivo fail to prime naive T cells but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes." J Exp Med **177**(3): 679-90.

- Rook, G. A., D. B. Lowrie, et al. (2007). "Immunotherapeutics for tuberculosis in experimental animals: is there a common pathway activated by effective protocols?" J Infect Dis **196**(2): 191-8.
- Rosada, R. S., L. G. de la Torre, et al. (2008). "Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes." BMC Immunol **9**: 38.
- Rubakova, E., S. Petrovskaya, et al. (2007). "Specificity and efficacy of dendritic cell-based vaccination against tuberculosis with complex mycobacterial antigens in a mouse model." Tuberculosis (Edinb) **87**(2): 134-44.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med **182**(2): 389-400.
- Santos-Junior, R. R., A. Sartori, et al. (2005). "Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis." Hum Gene Ther **16**(11): 1338-45.
- Shaw, J., V. Grund, et al. (2002). "Dendritic cells pulsed with a recombinant chlamydial major outer membrane protein antigen elicit a CD4(+) type 2 rather than type 1 immune response that is not protective." Infect Immun **70**(3): 1097-105.
- Shaw, J. H., V. R. Grund, et al. (2001). "Expression of genes encoding Th1 cell-activating cytokines and lymphoid homing chemokines by chlamydia-pulsed dendritic cells correlates with protective immunizing efficacy." Infect Immun **69**(7): 4667-72.
- Shedlock, D. J. and D. B. Weiner (2000). "DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity." J Leukoc Biol **68**(6): 793-806.
- Silva, C. L. and D. B. Lowrie (2000). "Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **68**(6): 3269-74.
- Skeiky, Y. A. and J. C. Sadoff (2006). "Advances in tuberculosis vaccine strategies." Nat Rev Microbiol **4**(6): 469-76.
- Smith, H. A., K. L. Goldenthal, et al. (1997). "Workshop on the control and standardization of nucleic acid vaccines. Bethesda, Maryland, 8 February 1996." Vaccine **15**(8): 931-3.
- Su, H., R. Messer, et al. (1998). "Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with nonviable Chlamydiae." J Exp Med **188**(5): 809-18.
- Su, Z., J. Dannull, et al. (2005). "Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer." J Immunol **174**(6): 3798-807.
- Su, Z., M. V. Peluso, et al. (2001). "The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease." Eur J Immunol **31**(3): 947-58.
- Suzuki, T., T. Fukuhara, et al. (2005). "Vaccination of dendritic cells loaded with interleukin-12-secreting cancer cells augments in vivo antitumor immunity: characteristics of syngeneic and allogeneic antigen-presenting cell cancer hybrid cells." Clin Cancer Res **11**(1): 58-66.

- Tailleux, L., O. Neyrolles, et al. (2003). "Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells." J Immunol **170**(4): 1939-48.
- Tanghe, A., S. D'Souza, et al. (2001). "Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting." Infect Immun **69**(5): 3041-7.
- Tascon, R. E., M. J. Colston, et al. (1996). "Vaccination against tuberculosis by DNA injection." Nat Med **2**(8): 888-92.
- Tascon, R. E., C. S. Soares, et al. (2000). "Mycobacterium tuberculosis-activated dendritic cells induce protective immunity in mice." Immunology **99**(3): 473-80.
- Toldbod, H. E., R. Agger, et al. (2003). "Potent influence of bovine serum proteins in experimental dendritic cell-based vaccination protocols." Scand J Immunol **58**(1): 43-50.
- Topham, D. J., R. A. Tripp, et al. (1996). "Quantitative analysis of the influenza virus-specific CD4+ T cell memory in the absence of B cells and Ig." J Immunol **157**(7): 2947-52.
- Torres, C. A., A. Iwasaki, et al. (1997). "Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations." J Immunol **158**(10): 4529-32.
- Trombone, A. P., C. L. Silva, et al. (2007). "Tissue distribution of DNA-Hsp65/TDM-loaded PLGA microspheres and uptake by phagocytic cells." Genet Vaccines Ther **5**: 9.
- Tsan, M. F. and B. Gao (2009). "Heat shock proteins and immune system." J Leukoc Biol.
- Ulmer, J. B. (2001). "An update on the state of the art of DNA vaccines." Curr Opin Drug Discov Devel **4**(2): 192-7.
- Van den Bosch, G. A., P. Ponsaerts, et al. (2005). "Ex vivo induction of viral antigen-specific CD8 T cell responses using mRNA-electroporated CD40-activated B cells." Clin Exp Immunol **139**(3): 458-67.
- van Essen, D., P. Dullforce, et al. (2000). "Cellular interactions involved in Th cell memory." J Immunol **165**(7): 3640-6.
- Van Meirvenne, S., L. Straetman, et al. (2002). "Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA." Cancer Gene Ther **9**(9): 787-97.
- Van Tendeloo, V. F., P. Ponsaerts, et al. (2001). "Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells." Blood **98**(1): 49-56.
- von Bergwelt-Baildon, M. S., R. H. Vonderheide, et al. (2002). "Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application." Blood **99**(9): 3319-25.
- Vordermeier, H. M., N. Venkataprasad, et al. (1996). "Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice." Clin Exp Immunol **106**(2): 312-6.
- Wang, L. M., Y. L. Bai, et al. (2008). "Immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding the fusion protein of mycobacterium heat shock protein 65 (Hsp65) with human interleukin-2 against *Mycobacterium tuberculosis* in BALB/c mice." Apmis **116**(12): 1071-81.

- Watts, C. and S. Amigorena (2000). "Antigen traffic pathways in dendritic cells." Traffic **1**(4): 312-7.
- Weide, B., C. Garbe, et al. (2008). "Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination." Immunol Lett **115**(1): 33-42.
- Weissman, D., H. Ni, et al. (2000). "HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response." J Immunol **165**(8): 4710-7.
- Wiethe, C., A. Debus, et al. (2008). "Dendritic cell differentiation state and their interaction with NKT cells determine Th1/Th2 differentiation in the murine model of *Leishmania major* infection." J Immunol **180**(7): 4371-81.
- Wolf, A. J., B. Linas, et al. (2007). "Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo." J Immunol **179**(4): 2509-19.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.
- Xue, T., E. Stavropoulos, et al. (2004). "RNA encoding the MPT83 antigen induces protective immune responses against Mycobacterium tuberculosis infection." Infect Immun **72**(11): 6324-9.
- Young, L. J., N. S. Wilson, et al. (2007). "Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(45): 17753-8.
- Yu, H., L. A. Babiuk, et al. (2007). "Immunity and protection by adoptive transfer of dendritic cells transfected with hepatitis C NS3/4A mRNA." Vaccine **25**(10): 1701-11.
- Yu, H., L. A. Babiuk, et al. (2008). "Strategies for loading dendritic cells with hepatitis C NS5a antigen and inducing protective immunity." J Viral Hepat **15**(6): 459-70.
- Yu, H., H. Huang, et al. (2006). "Dendritic cells pulsed with hepatitis C virus NS3 protein induce immune responses and protection from infection with recombinant vaccinia virus expressing NS3." J Gen Virol **87**(Pt 1): 1-10.
- Zanetti, M., P. Castiglioni, et al. (2004). "B lymphocytes as antigen-presenting cell-based genetic vaccines." Immunol Rev **199**: 264-78.
- Zarate-Blades, C. R., V. L. Bonato, et al. (2009). "Comprehensive gene expression profiling in lungs of mice infected with Mycobacterium tuberculosis following DNAhsp65 immunotherapy." J Gene Med **11**(1): 66-78.
- Zhang, H. M., L. W. Zhang, et al. (2006). "Comparative analysis of DC fused with tumor cells or transfected with tumor total RNA as potential cancer vaccines against hepatocellular carcinoma." Cytotherapy **8**(6): 580-8.
- Zhou, W. Z., D. S. Hoon, et al. (1999). "RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization." Hum Gene Ther **10**(16): 2719-24.
- Zobywalski, A., M. Javorovic, et al. (2007). "Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70." J Transl Med **5**: 18.

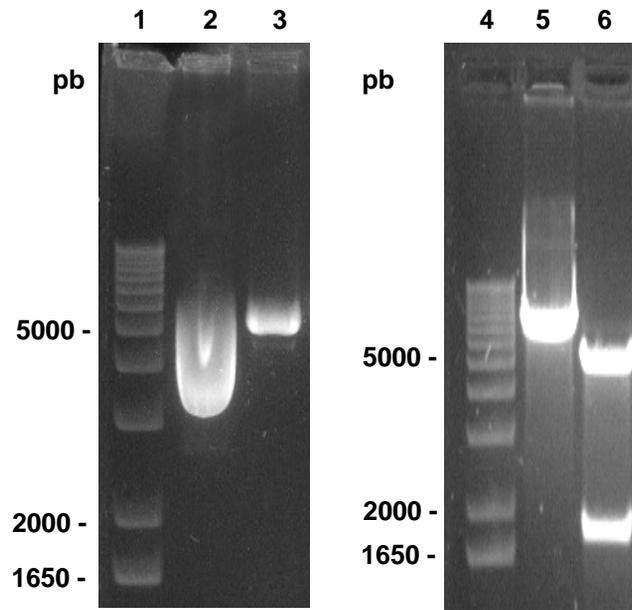
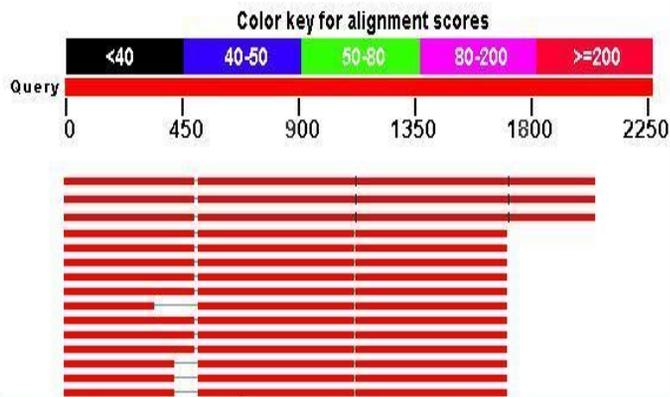


Figura 1. Perfil eletroforético dos plasmídeos pcDNA3 e pcDNA3A-Hsp65. Após a digestão enzimática as referidas amostras de DNA plasmideal foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% sendo as bandas visualizadas pela coloração com brometo de etídio. Canaletas 1 e 4: 1kb DNA Ladder (Invitrogen), utilizado como marcador de pares de base (pb); Canaleta 2: pcDNA3 não digerido; Canaleta 3: pcDNA3 digerido com *Bam* HI ; Canaleta 5: pcDNA3A-Hsp65 não digerido; Canaleta 6: pcDNA3A-Hsp65 digerido com *Bam* HI e *Apa* I.



| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|---|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| AL583918.1 | Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 2/10 | 1116 | 3745 | 89% | 0.0 | 100% |
| AL035159.1 | Mycobacterium leprae cosmid B1450 | 1116 | 3745 | 89% | 0.0 | 100% |
| M14341.1 | M.leprae 65 kd antigen, complete cds | 1116 | 3745 | 89% | 0.0 | 100% |
| AF456474.1 | Mycobacterium marinum isolate S4 heat shock protein 65 (hsp65) gene, partial cds | 736 | 1994 | 74% | 0.0 | 89% |
| AF456469.1 | Mycobacterium marinum strain cyprinum CC240299 heat shock protein 65 (hsp65) gene, partial cds | 736 | 1979 | 74% | 0.0 | 89% |
| CP000325.1 | Mycobacterium ulcerans Agy99, complete genome | 730 | 1990 | 74% | 0.0 | 89% |
| AF456475.1 | Mycobacterium ulcerans heat shock protein 65 (hsp65) gene, partial cds | 730 | 1990 | 74% | 0.0 | 89% |
| AF456470.1 | Mycobacterium marinum strain ATCC 927 heat shock protein 65 (hsp65) gene, partial cds | 725 | 1966 | 74% | 0.0 | 89% |
| DQ284772.1 | Mycobacterium avium strain HMC36 65 kDa heat shock protein gene, partial cds | 719 | 1757 | 68% | 0.0 | 88% |
| AF456471.1 | Mycobacterium marinum strain hellenicum DL045 heat shock protein 65 (hsp65) gene, partial cds | 719 | 1957 | 74% | 0.0 | 89% |
| AF456468.1 | Mycobacterium marinum strain eilaticum DL240490 heat shock protein 65 (hsp65) gene, partial cds | 719 | 1957 | 74% | 0.0 | 89% |
| CP000479.1 | Mycobacterium avium 104, complete genome | 713 | 1971 | 74% | 0.0 | 89% |
| DQ284778.1 | Mycobacterium intracellulare strain 90331 65 kDa heat shock protein gene, partial cds | 713 | 1879 | 71% | 0.0 | 89% |
| DQ284777.1 | Mycobacterium chimaera strain MI-1C 65 kDa heat shock protein gene, partial cds | 713 | 1874 | 71% | 0.0 | 89% |
| DQ284776.1 | Mycobacterium intracellulare strain FCC1804 65 kDa heat shock protein gene, partial cds | 713 | 1885 | 71% | 0.0 | 89% |
| DQ284775.1 | Mycobacterium intracellulare strain 96006 65 kDa heat shock protein gene, partial cds | 713 | 1885 | 71% | 0.0 | 89% |

Figura 2. Screenshot resultado Blastn para a sequência gerada para o plasmídeo pcDNA3A-Hsp65. Os três primeiros resultados gerados são condizentes com a proteína clonada no vetor.

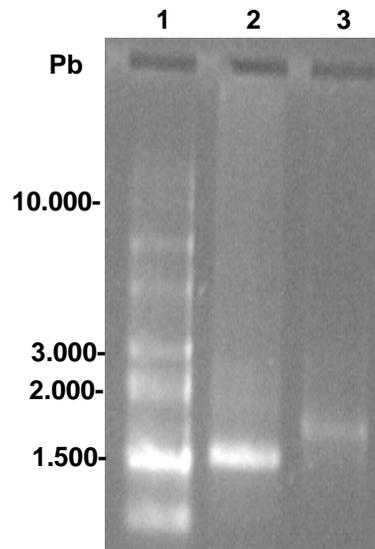


Figura 3. Perfil eletroforético do RNA mensageiro (mRNA-Hsp65). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5%, desnaturante e o perfil de bandas visualizados após coloração com brometo de etídio. Canaleta 1: 0,5-10 kb RNA Ladder (Invitrogen), utilizado como marcador de pares de base (Pb); Canaleta 2: mRNA-Hsp65 sem adição da cauda PoliA; Canaleta 3: mRNA-Hsp65 com a cauda PoliA.

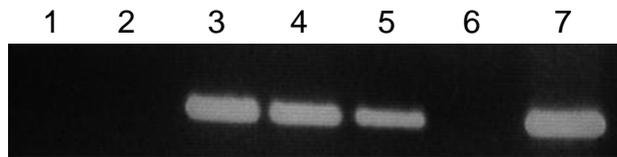


Figura 4. Detecção do mRNA-Hsp65 por RT-PCR. Após a transfecção (Transmessenger Transfection Reagent) das células HEK 293 com mRNA-Hsp65 as mesmas foram mantidas em cultura por diferentes períodos de tempo para análise da presença do mRNA-Hsp65 por RT-PCR. O RT-PCR foi realizado em culturas celulares após 30 minutos (canaleta 3) 2 horas (canaleta 4), 4 horas (canaleta 5), 8 horas (canaleta 6). Na canaleta 7 o controle positivo do RT-PCR usando o plasmídeo pcDNA3-Hsp65 como molde. A canaleta 1 mostra a reação sem a adição de cDNA e a canaleta 2 mostra a reação que utilizou cDNA proveniente de células que não receberam mRNA-Hsp65. As bandas foram visualizadas em gel de agarose 1,5% após corrida eletroforética e corado com brometo de etídeo.

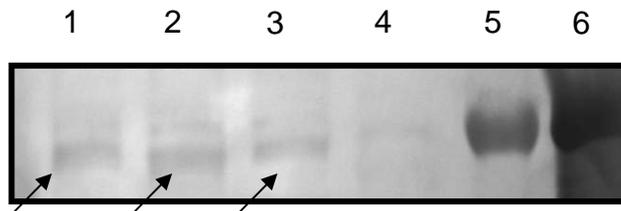


Figura 5. Avaliação in vitro da expressão da proteína Hsp65 por Western blotting. Células HEK293 (6×10^5) foram transfectadas (Transmessenger Transfection Reagent) com 2 μg de mRNA-Hsp65. Após diversos períodos de incubação com mRNA-Hsp65 (1, 2 e 4 horas) as células foram lisadas e as proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida 10%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), seguida da eletrotransferência das bandas protéicas para membrana de nitrocelulose. Foi utilizado o anticorpo primário anti-Hsp65 seguido do secundário conjugado com peroxidase alcalina e revelação com DAB. Canaleta 1: 4h após a incubação com o mRNA-Hsp65; Canaleta 2: 2h após a incubação com o mRNA-Hsp65; Canaleta 3: 1h após a incubação com o mRNA-Hsp65; Canaleta 4: somente células HEK 293; Canaleta 5: padrão de peso molecular (Fermentas Life Sciences – banda correspondente a 72kDa), Canaleta 6: proteína Hsp65 recombinante. Setas: indicam a banda correspondente a proteína Hsp65.

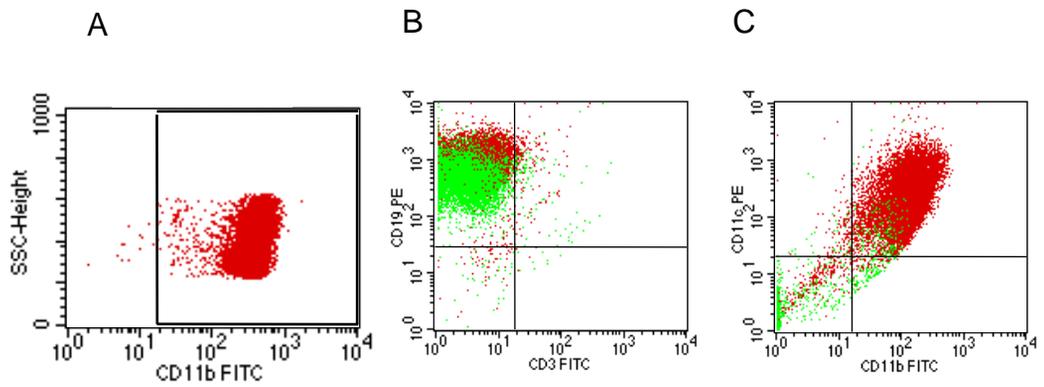


Figura 6. Obtenção de macrófagos, linfócitos B e células dendríticas.

Grau de pureza de macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos Balb/c, 99.85% (A). Eficiência de purificação de linfócitos B provenientes do baço de camundongos Balb/c utilizando seleção negativa com *beads* magnéticas CD43+, 94.34% (B). Rendimento do processo de diferenciação de células dendríticas provenientes da medula óssea de animais Balb/c, 60.32% (C).

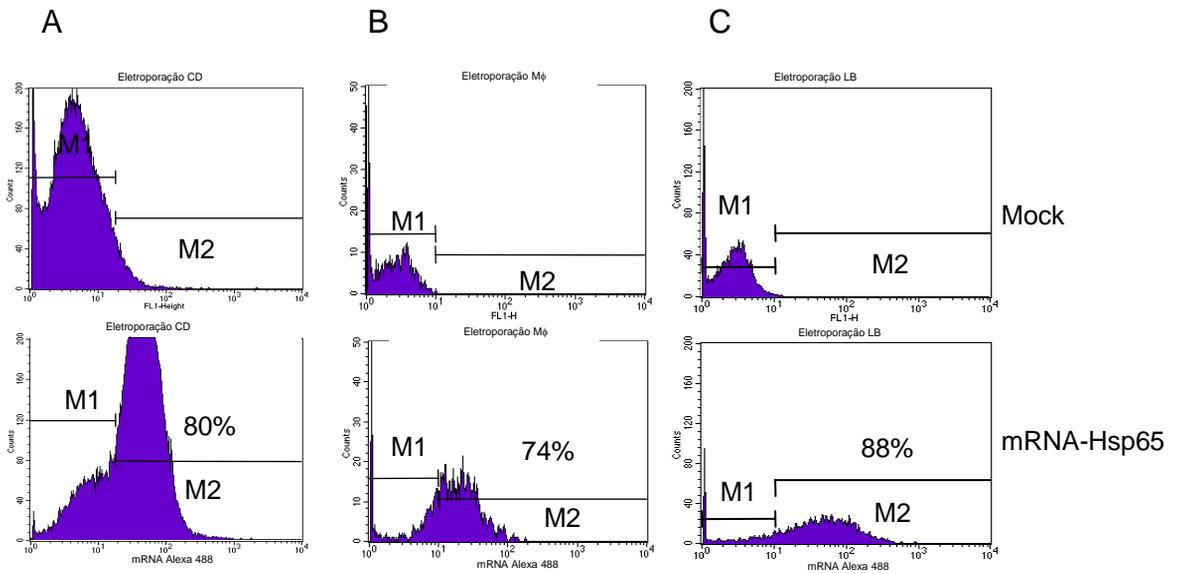


Figura 7. Avaliação da eficiência da eletroporação. Células dendríticas (A), macrófagos peritoneais (B) e linfócitos B (C) apenas eletroporados (mock) ou eletroporados com 5 μ g de mRNA-Hsp65 marcado com Alexa Fluor 488. Após a eletroporação as células foram fixadas com formaldeído 1% e a incorporação do mRNA-Hsp65 fluorescente foi analisada por citometria de fluxo.

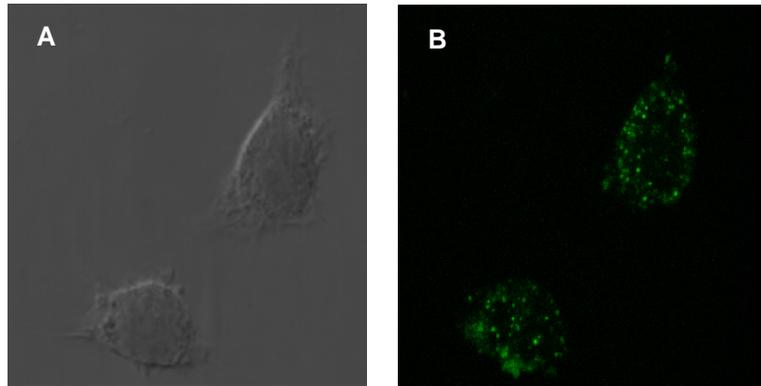


Figura 8. Transfecção de macrófagos peritoneais com mRNA-Hsp65 Alexa 488. (A) e (B) Imagens de microscopia confocal de macrófagos peritoneais (5×10^4 células) 30 minutos após contato com mRNA-Hsp65 ($5 \mu\text{g}$) marcado com Alexa 488.

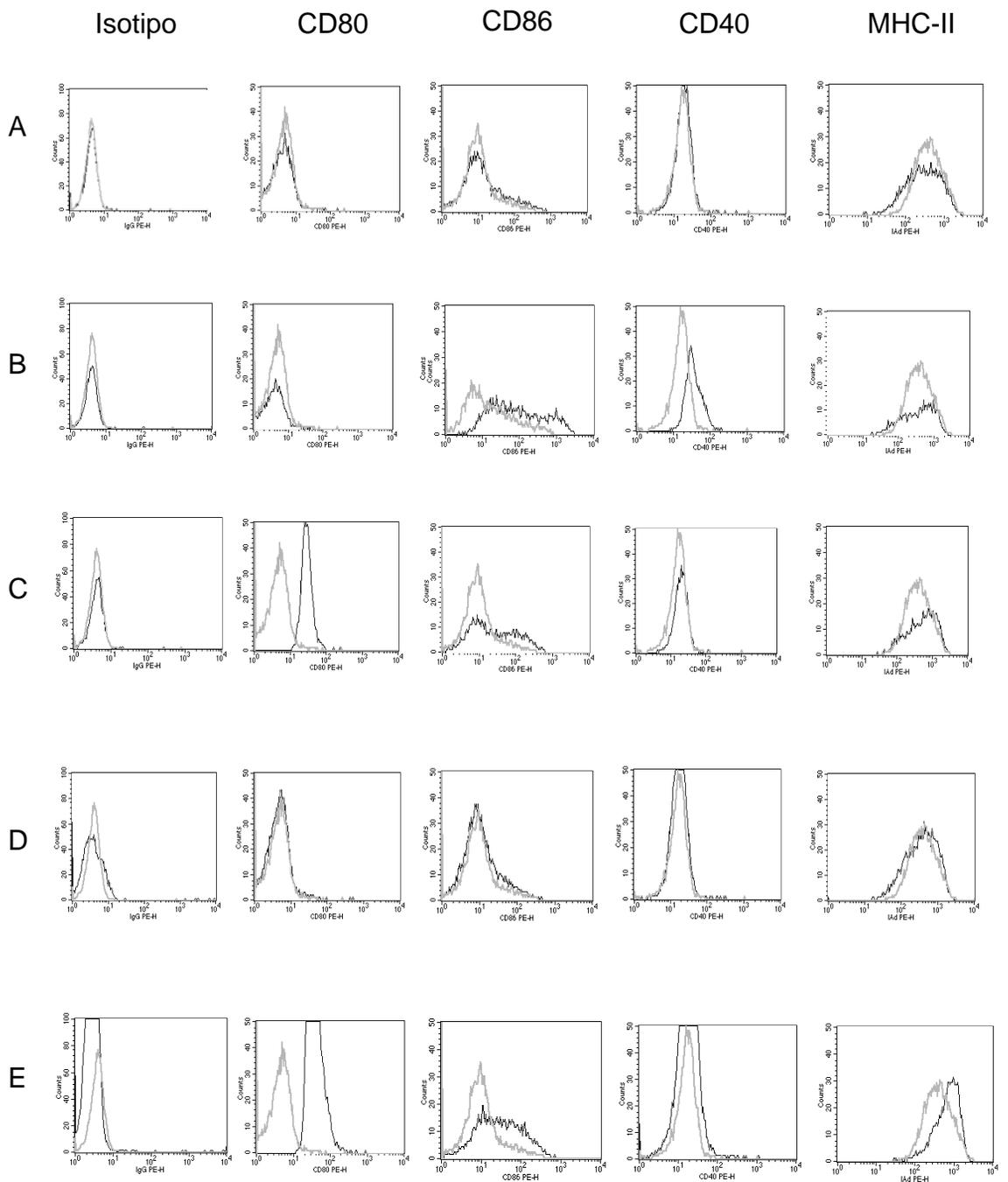


Figura 9. Caracterização da expressão de moléculas de co-estimulatórias em linfócitos B (LB). Histogramas representativos da expressão de CD80, CD86, CD40 e MHCII – em LB sob diferentes condições: não estimuladas - linhas cinzas — ou estimuladas linhas pretas — . A) células estimuladas por contato com mRNA-Hsp65 (5µg/mL); B) células somente eletroparadas (mock); C) células eletroporadas com mRNA-Hsp65 (5µg/mL); D) pulsadas com proteína recombinante Hsp65 (50µg/mL, Polimixina B 30 µg/mL); E) ou células tratadas com LPS (1µg/mL).

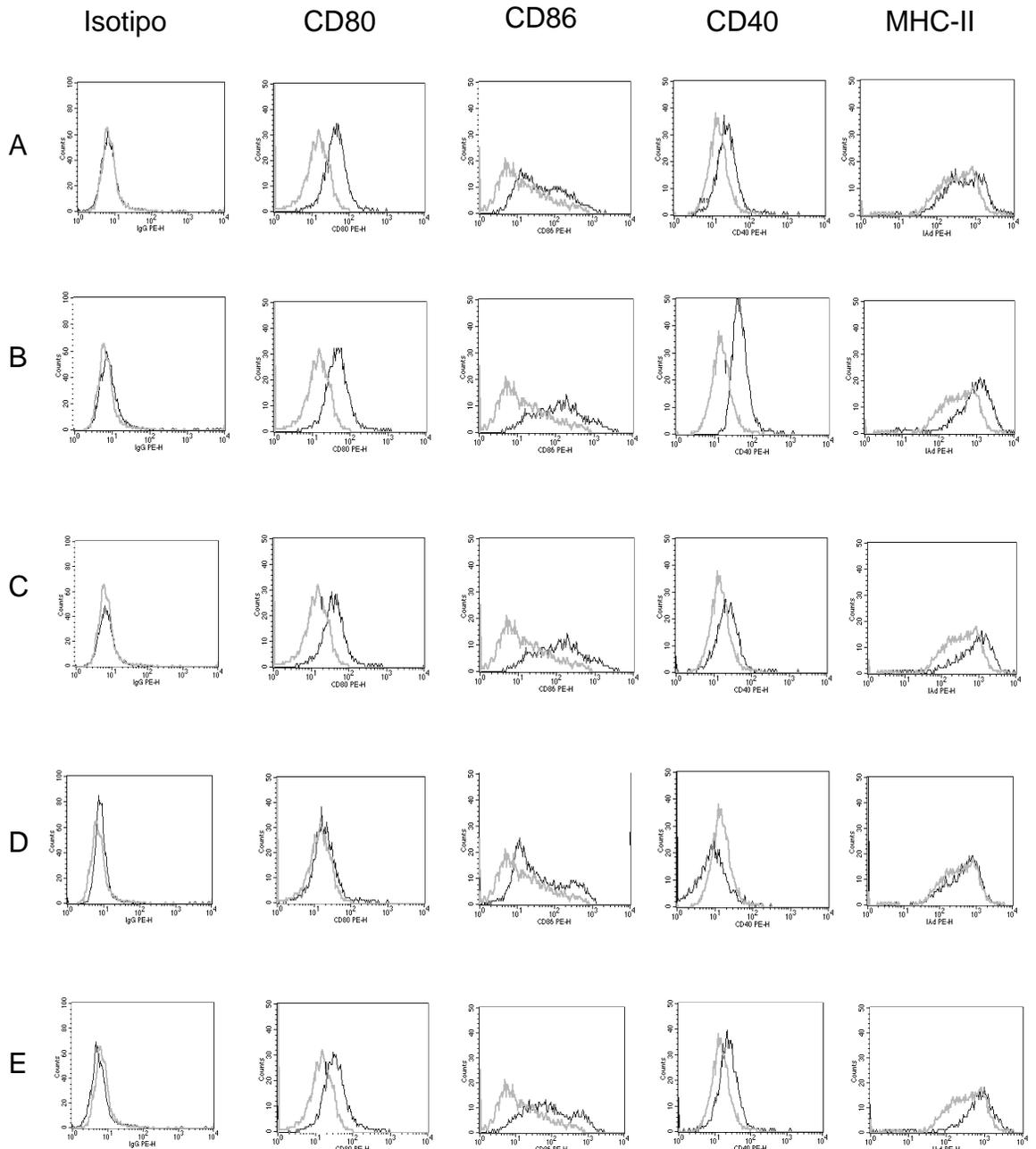


Figura 10. Caracterização da expressão de moléculas de co-estimulatórias em macrófagos (Mφs). Histogramas representativos da expressão de CD80, CD86, CD40 e MHCII – em Mφ sob diferentes condições: não estimuladas - linhas cinzas  ou estimuladas linhas pretas . A) células estimuladas por contato com mRNA-Hsp65 (5μg/mL); B) células somente eletroparadas (mock); C) células eletroporadas com mRNA-Hsp65 (5μg/mL); D) pulsadas com proteína recombinante Hsp65 (50μg/mL, Polimixina B 30 μg/mL); E) ou células tratadas com LPS (1μg/mL).

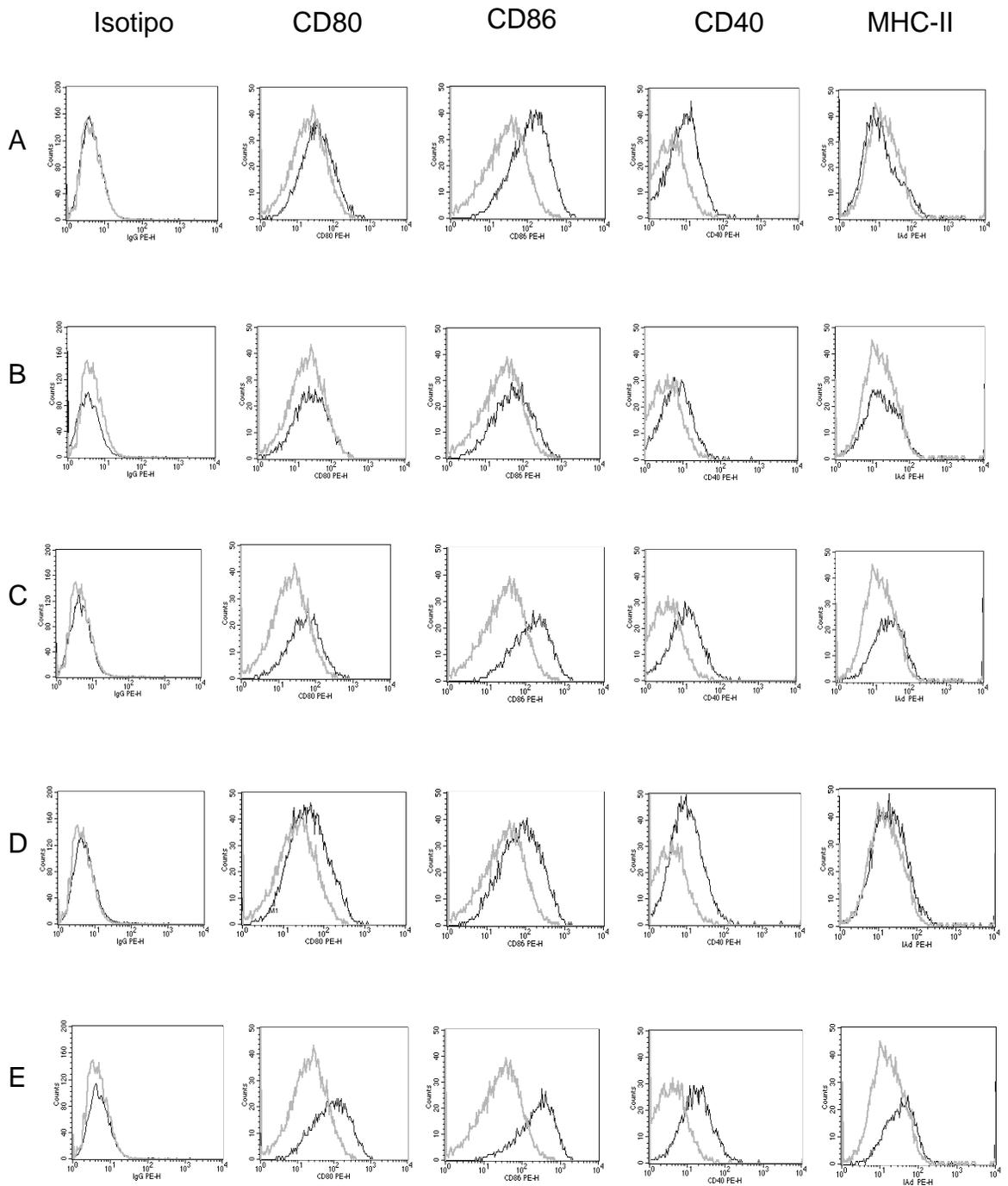


Figura 11. Caracterização da expressão de moléculas de co-estimulatórias em células dendríticas (CDs). Histogramas representativos da expressão de CD80, CD86, CD40 e MHCII – em CDs sob diferentes condições: não estimuladas - linhas cinzas  ou estimuladas linhas pretas . A) células estimuladas por contato com mRNA-Hsp65 (5µg/mL); B) células somente eletroparadas (mock); C) células eletroporadas com mRNA-Hsp65 (5µg/mL); D) pulsadas com proteína recombinante Hsp65 (50µg/mL, Polimixina B 30 µg/mL); E) ou células tratadas com LPS (1µg/mL).

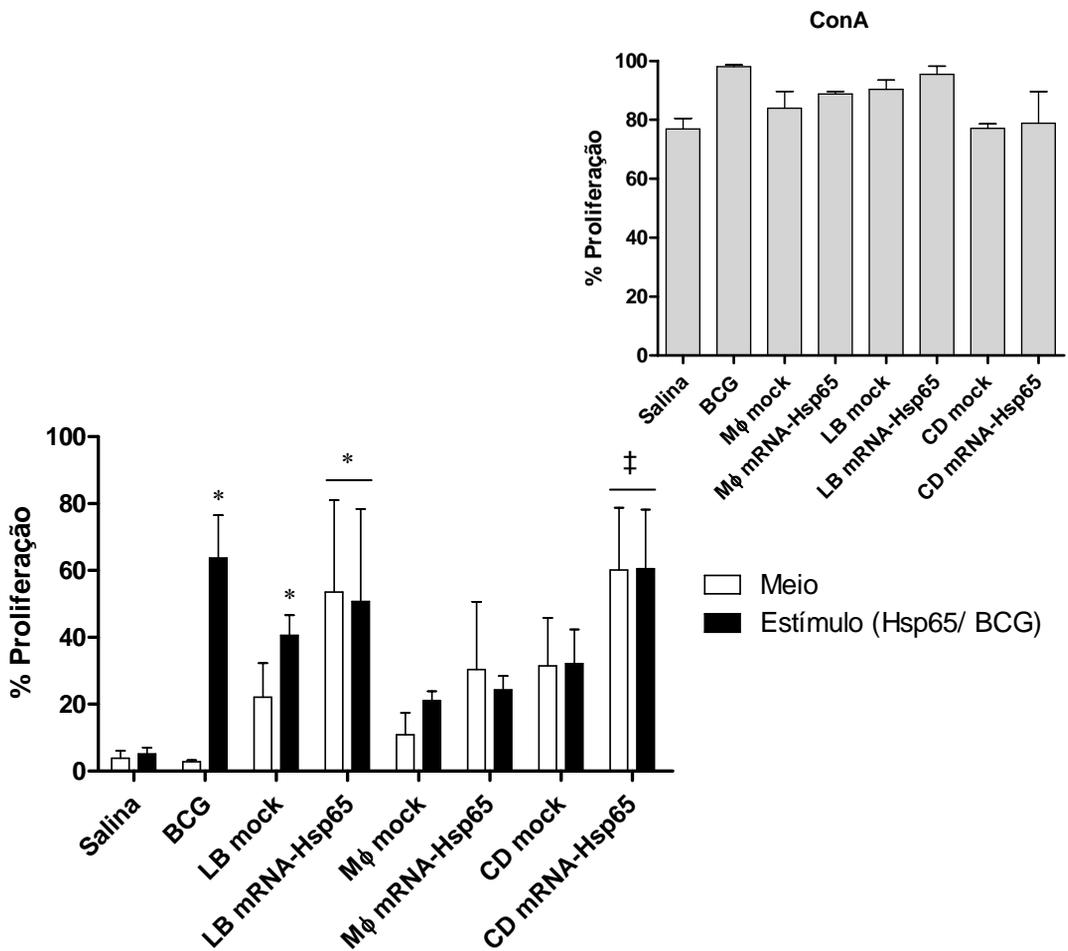


Figura 12. Capacidade proliferativa de células totais do baço de animais vacinados. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e os baços foram extraídos para a avaliação da atividade proliferativa quando estimulados com a proteína Hsp65 ou lisado de BCG por 72 horas, por meio de marcação com CFSE. A proliferação foi considerada significativa quando * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e BCG/meio. ‡ $p < 0,05$ em relação ao salina, BCG/meio, LB mock/meio, Mφ mock e Mφ mRNA-Hsp65 (meio e Hsp65), CD mock meio/Hsp65. Os valores apresentados no gráfico representam a média e o desvio padrão da porcentagem de células que proliferaram ($n=3$). O gráfico sobreposto representa a proliferação com o estímulo policlonal Concanavalina A (ConA). LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; s.c: subcutâneo; mRNA-Hsp65: 5 μ g.

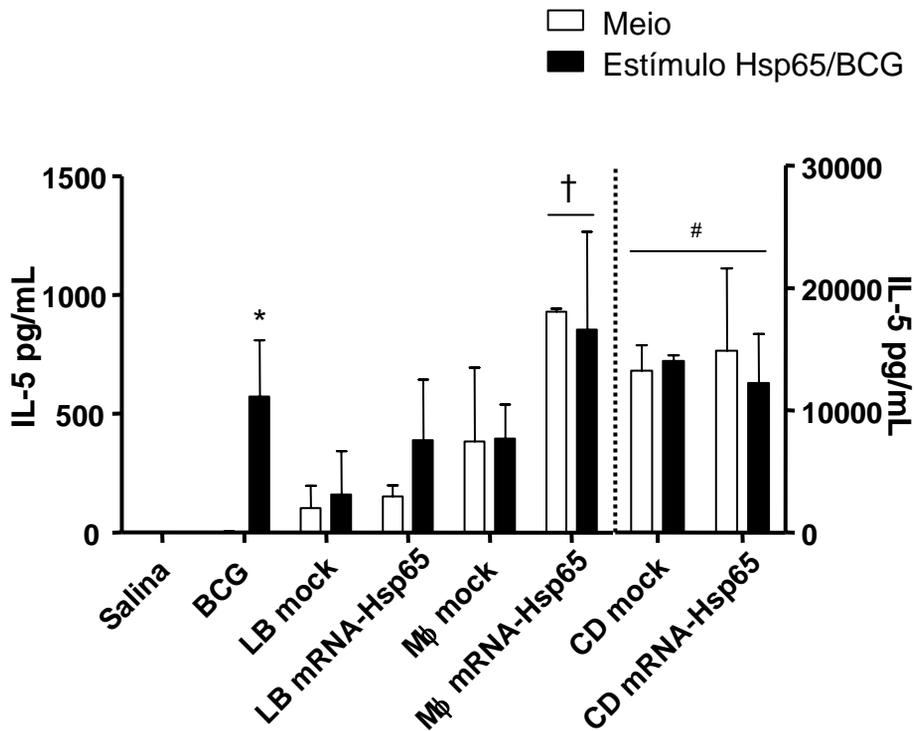


Figura 13. Determinação da produção de IL-5 por células totais do baço de animais vacinados. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e os baços extraídos para a avaliação da produção de IL-5 através do ensaio de ELISA. Células totais do baço foram estimulados com Hsp65 ou lisado de BCG por 48 horas e a produção de IL-5 avaliada através do ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=3). A produção foi considerada significativa quando * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina e às demais estratégias vacinais. † $p < 0,05$ em relação aos grupos salina, BCG/meio, LB mock, LBmRNA-hsp65 e Mφ mock (meio e Hsp65). LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; s.c: subcutâneo; mRNA-Hsp65: 5 μ g.

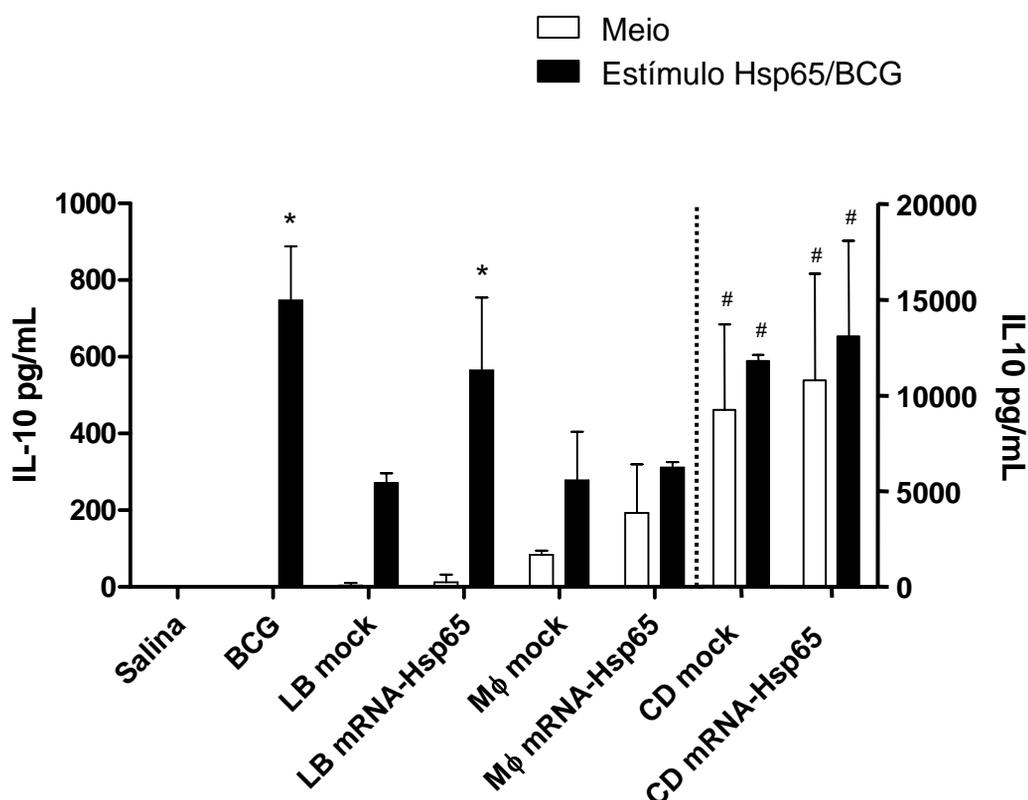


Figura 14. Determinação da produção de IL-10 por células totais do baço de animais vacinados. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e os baços extraídos para a avaliação da produção de IL-10 através do ensaio de ELISA. Células totais do baço foram estimulados com Hsp65 ou lisado de BCG por 48 horas e a produção de IL-10 avaliada através do ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo ($n=3$). A produção foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina, LB mock, Mφ mock e Mφ mRNA-Hsp65. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina e às demais estratégias vacinais. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; s.c: subcutâneo; mRNA-Hsp65: 5 μ g.

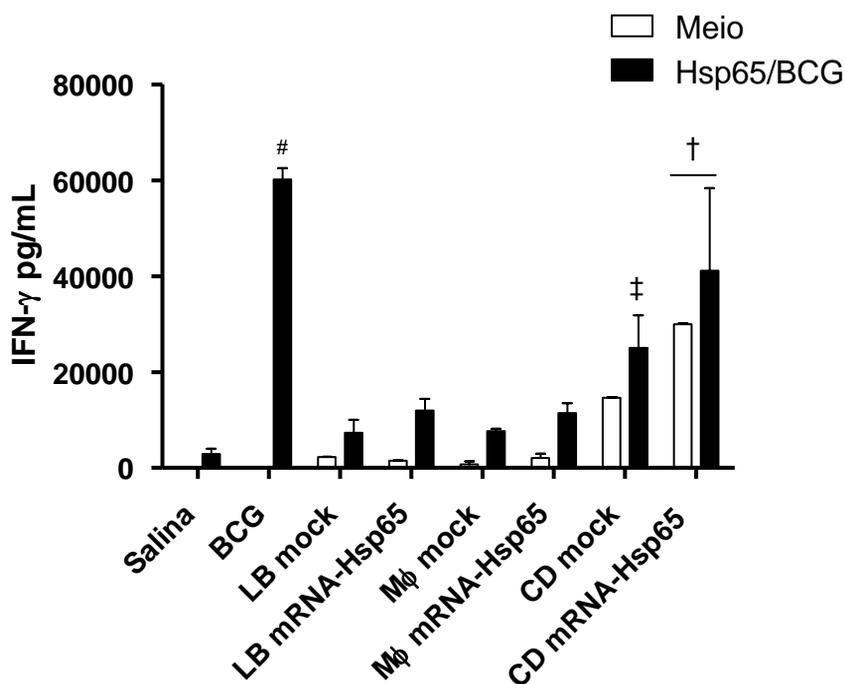


Figura 15. Determinação da produção de IFN- γ por células totais do baço de animais vacinados. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias após a imunização os animais foram sacrificados e os baços extraídos para a avaliação da produção de IFN- γ . Células totais do baço foram estimulados com Hsp65 ou lisado de BCG por 48 horas e a produção de IFN- γ avaliada através do ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=3). A produção foi considerada significativa quando # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e BCG/meio. ‡ $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina, BCG/meio, LB mock, LB mRNA-Hsp65/meio Mo mok, Mo mRNA-Hsp65 meio. † $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, LB mock, LB mRNA-Hsp65, M ϕ mock e M ϕ mRNA-Hsp65 LB: linfócito B, M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; s.c.: subcutânea; mRNA-Hsp65: 5 μ g.

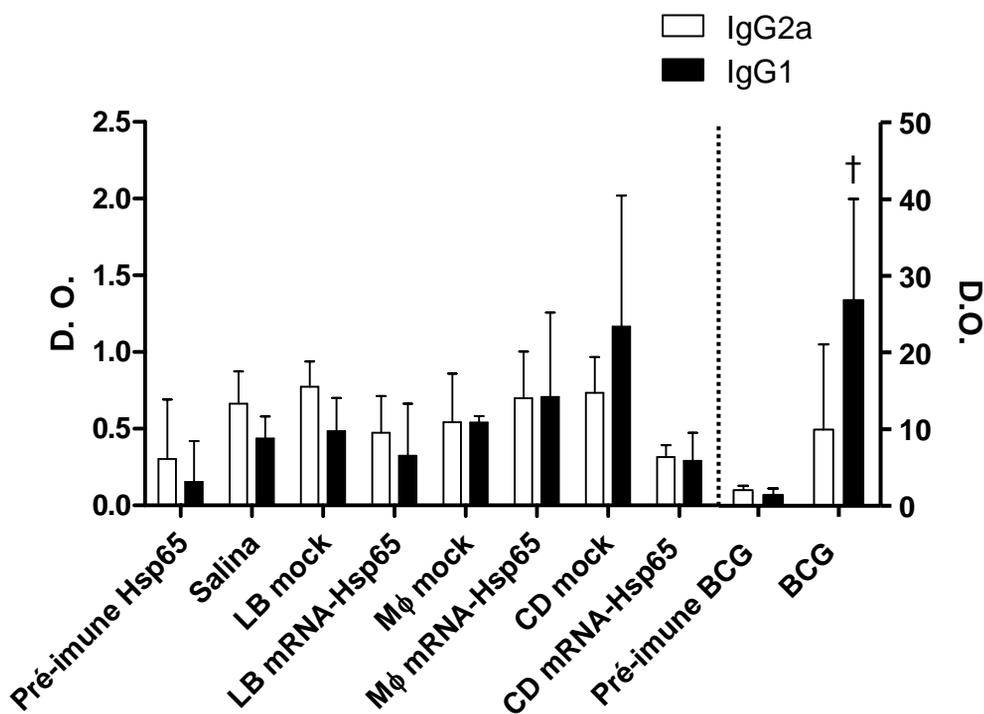


Figura 16. Determinação da produção de anticorpos IgG2A e IgG1 anti-Hsp65/BCG. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). O soro foi coletado no primeiro dia do experimento (Pré-Imune) antes das imunizações e após 15 dias a ultima imunização. Os níveis de anticorpos anti-Hsp65 e anti-BCG (B) foram determinados por ELISA e os resultados são representados pela média e desvio padrão ($n=3$) da Densidade Ótica (D.O.). A produção foi considerada significativa quando $\dagger p < 0,05$ em relação aos demais grupos. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; s.c:subcutânea; mRNA-Hsp65: 5 μ g.

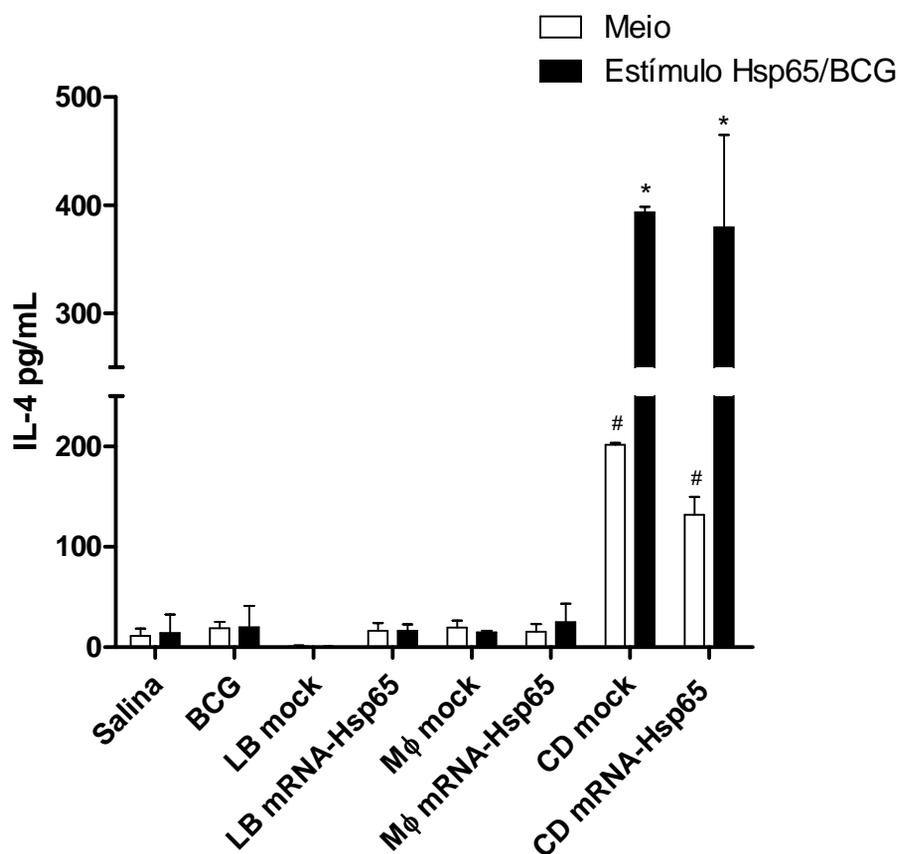


Figura 17. Produção de IL-4 por células totais do pulmão de animais vacinados e infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a última imunização os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos de *M. tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após a infecção os pulmões foram extraídos para a avaliação da produção de IL-4. Células totais do pulmão foram estimulados com Hsp65 ou BCG por 48 horas e a produção de IL-4 avaliada através do ensaio de ELISA. Os resultados são representados pela média e desvio padrão do grupo (n=3). A produção foi considerada significativa quando # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, BCG, LB mock, LB mRNA-Hsp65, Mφ mock e Mφ mRNA-Hsp65. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, BCG, LB mock, LB mRNA-Hsp65, Mφ mock e Mφ mRNA-Hsp65, CD mock/meio, CD mRNA-Hsp65/meio. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; s.c.: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg.

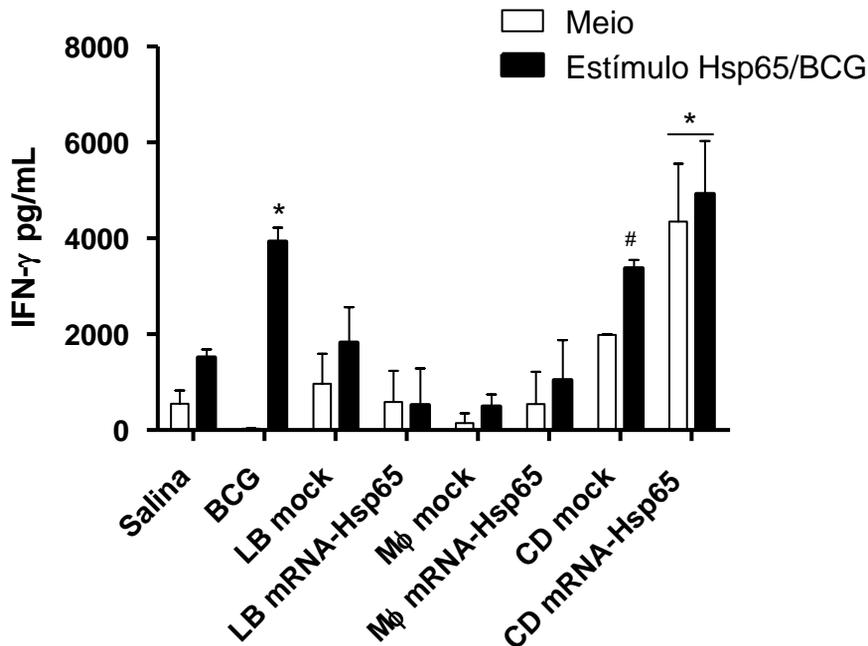


Figura 18. Produção de IFN- γ por células totais do pulmão de animais vacinados e infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados com as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a última imunização os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos de *M. tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após a infecção os pulmões foram extraídos para a avaliação da produção de IFN- γ . Células totais do pulmão foram estimulados com a proteína Hsp65 ou lisado de BCG por 48 horas e a produção de IFN- γ avaliada através do ensaio de ELISA. Os resultados são representados pela média e desvio padrão do grupo (n=3). A produção foi considerada significativa quando * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, BCG, LB mock, LB mRNA-Hsp65, M ϕ mock e M ϕ mRNA-Hsp65 e CD mock/meio. # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina/meio, LB mock/meio, LB mRNA-Hsp65, M ϕ mock e M ϕ mRNA-Hsp65. LB: linfócito B, M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; s.c.: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g.

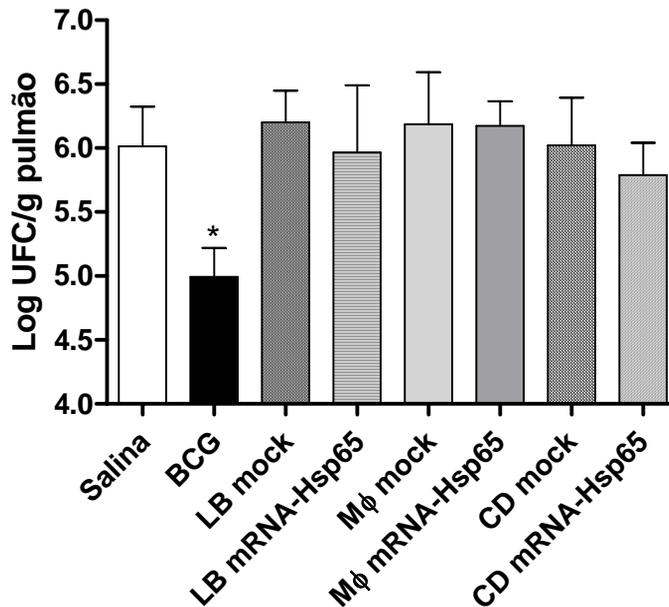


Figura 19. Quantificação das UFCs provenientes de pulmão de camundongos vacinados e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, 1×10^6 células, i.v) e APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (1×10^6 células, i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, i.v. Trinta dias após a imunização os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônias. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

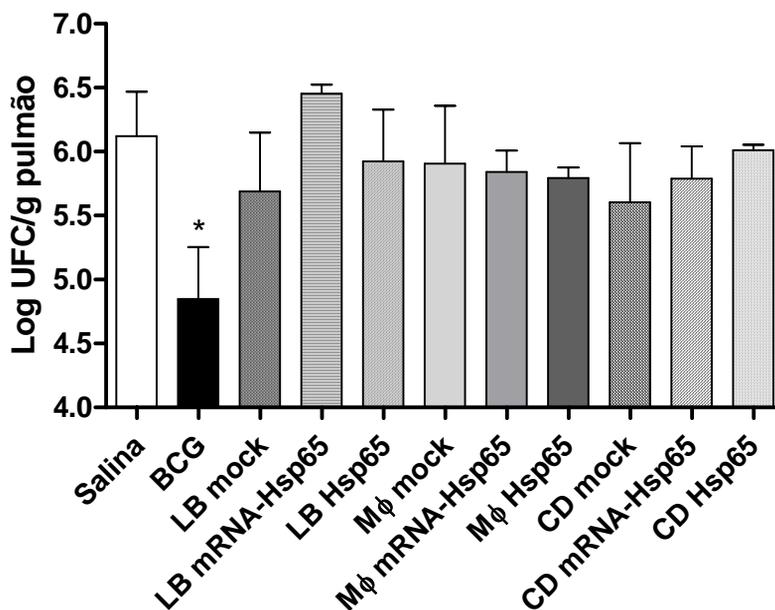


Figura 20. Quantificação das UFCs provenientes de pulmão de camundongos vacinados e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v) e APCs pulsadas com a proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, i.v. Trinta dias após a imunização os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônias. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

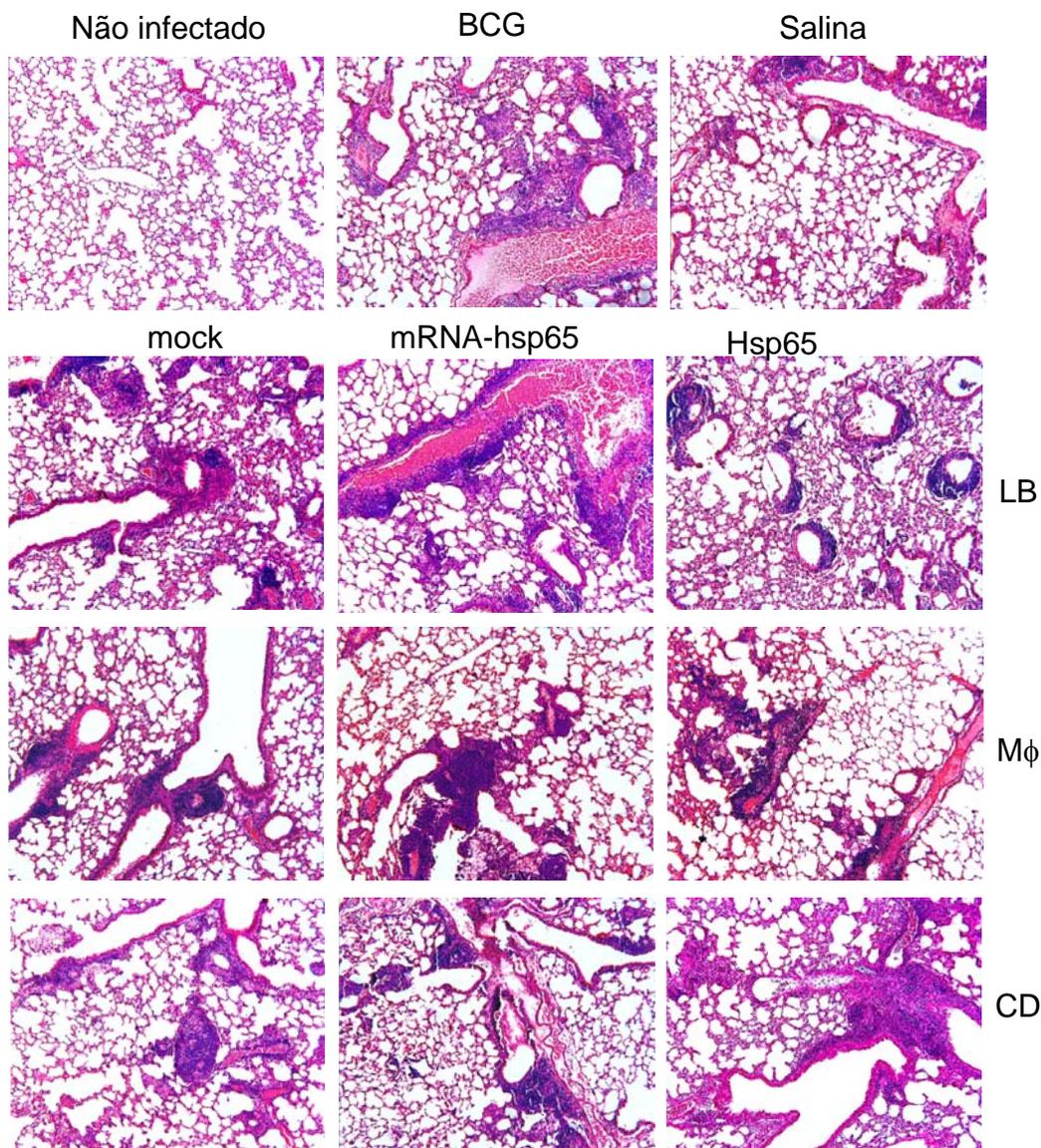


Figura 21. Cortes histológicos de pulmão de camundongos vacinados e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a imunização os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. Tamanho original 40x. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

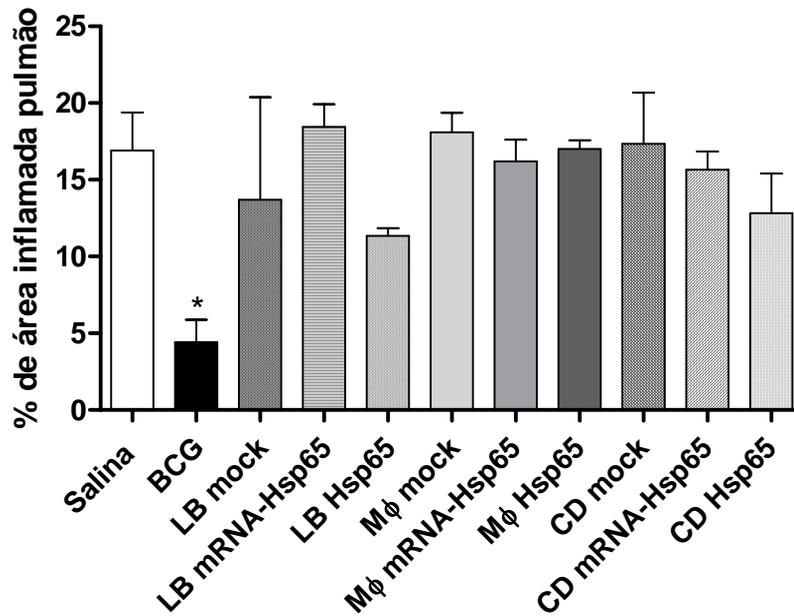


Figura 22. Análise morfométrica de cortes histológicos de pulmão de camundongos vacinados e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*.

Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). trinta dias após a vacinação os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. Tamanho original 40x. A quantificação do infiltrado inflamatório realizada com o programa de análise de imagens Image J. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

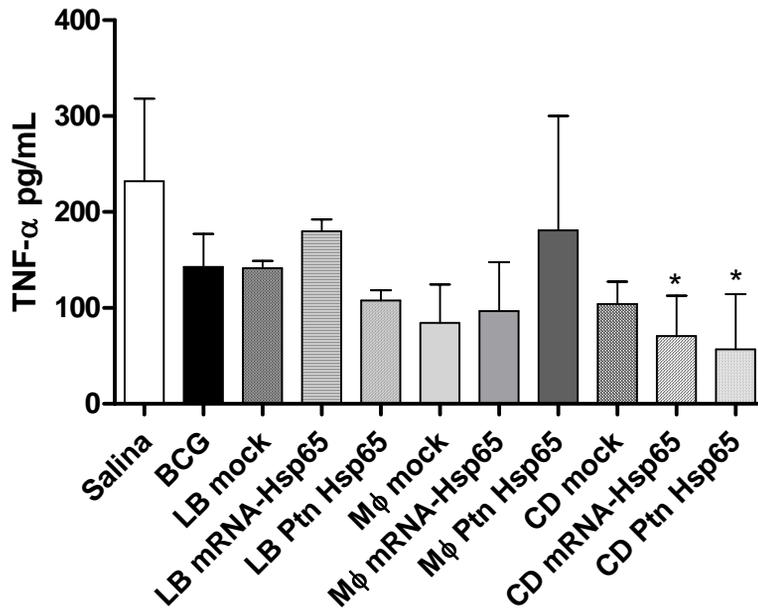


Figura 23. Níveis de TNF- α presentes no homogenato do pulmão de animais vacinados (2 doses) e infectados com *M. tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v) e salina (i.v). Quinze dias após a segunda dose os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, os pulmões coletados e os níveis de TNF- α presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

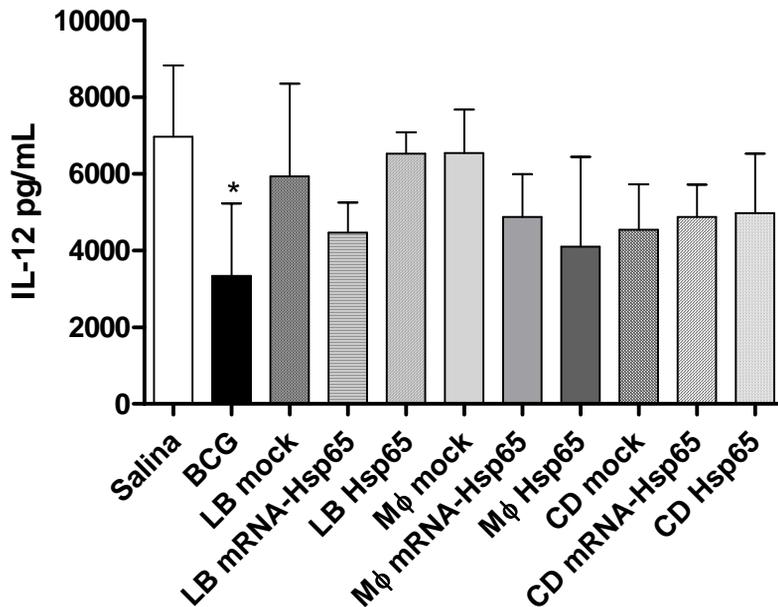


Figura 24. Níveis de IL-12 presentes no homogenato do pulmão de animais vacinados (2 doses) e infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com a proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v) e salina (i.v). Quinze dias após a segunda dose os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, os pulmões coletados e os níveis de IL-12 presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

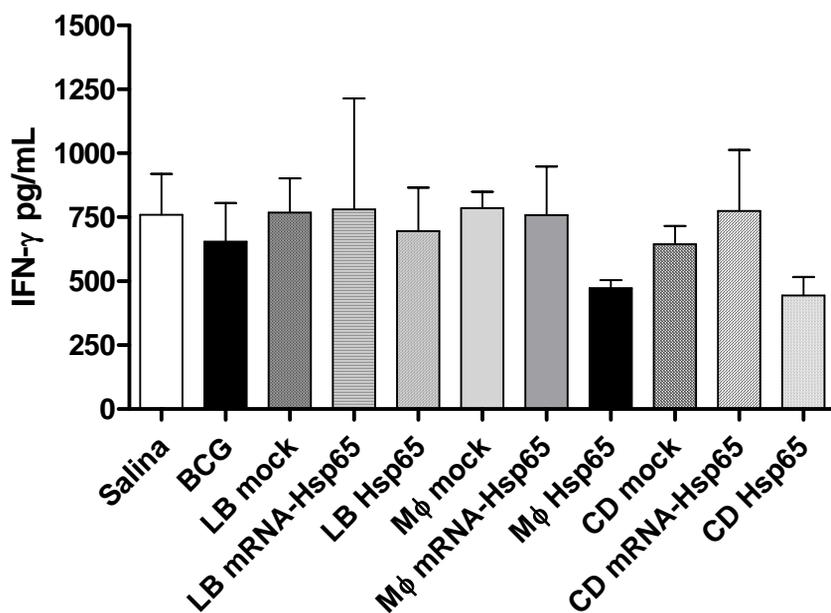


Figura 25. Níveis de IFN- γ presentes no homogenato do pulmão de animais vacinados (2 doses) e infectados com *M. tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v) e salina (i.v). Quinze dias após a segunda dose os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, os pulmões coletados e os níveis de IFN- γ presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

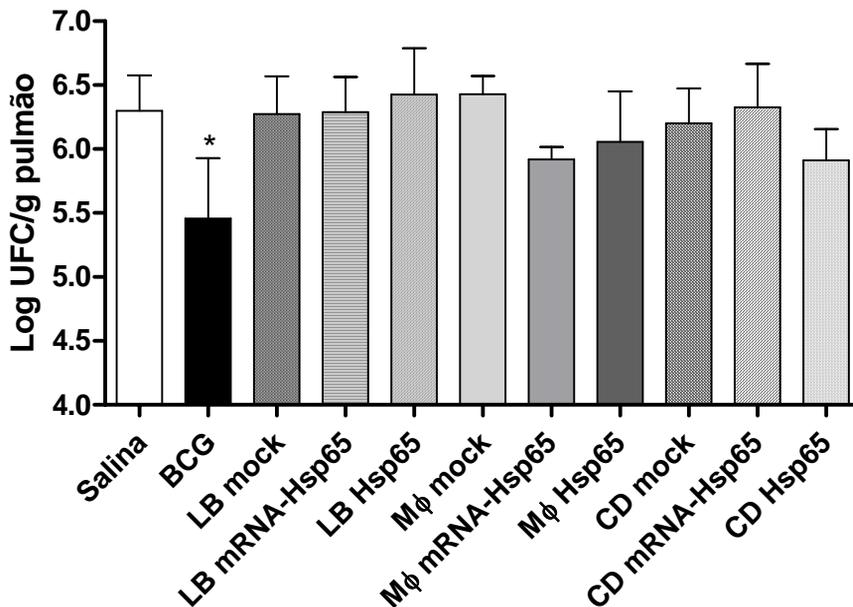


Figura 26. Quantificação das UFCs provenientes de pulmão de camundongos vacinados (2 doses) e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v) e salina (i.v). Quinze dias após a segunda doses os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônias. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

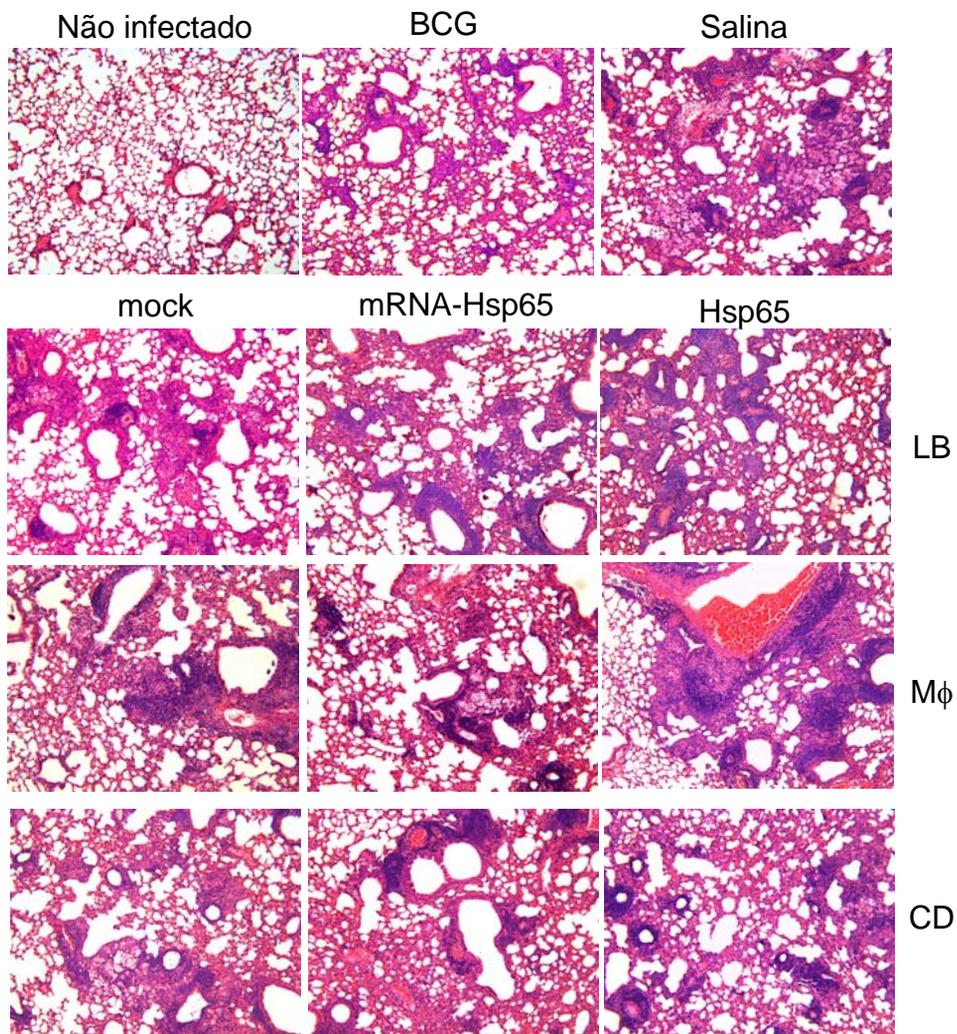


Figura 27. Cortes histológicos de pulmão de camundongos vacinados (2 doses) e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, i.v. Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). e salina (i.v). Quinze dias após a segunda doses os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. Tamanho original 40x. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

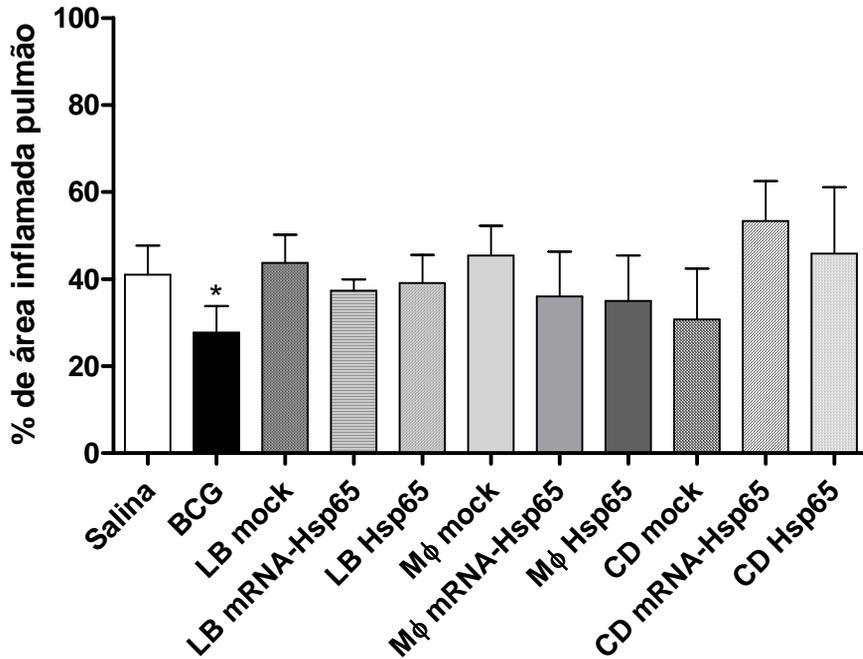


Figura 28. Análise morfométrica de cortes histológicos de pulmão de camundongos vacinados (2 doses) e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina (i.v). Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). e salina (i.v). Quinze dias após a segunda doses os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. Tamanho original 40x. A quantificação do infiltrado inflamatório realizada com o programa de análise de imagens Image J. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

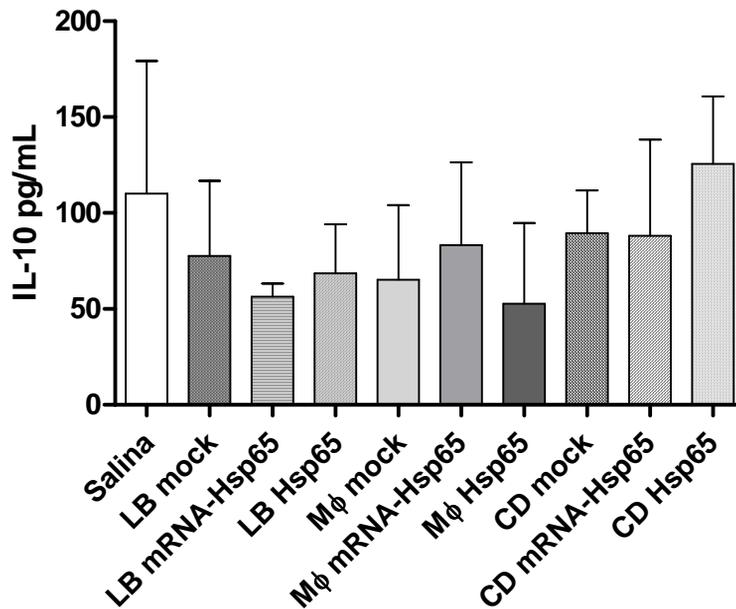


Figura 29. Níveis de IL-10 presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e tratados com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção receberam as abordagens terapêuticas: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a imunização os animais foram sacrificados tiveram os pulmões coletados e os níveis de IL-10 presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

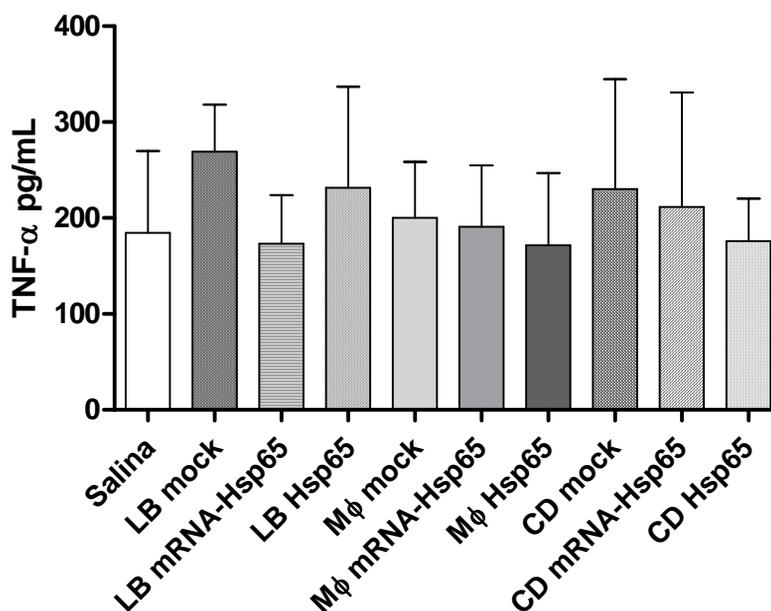


Figura 30. Níveis de TNF- α presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e tratados com as abordagens vacinais. . Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção receberam as abordagens terapêuticas: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a imunização os animais foram sacrificados tiveram os pulmões coletados e os níveis de TNF- α presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

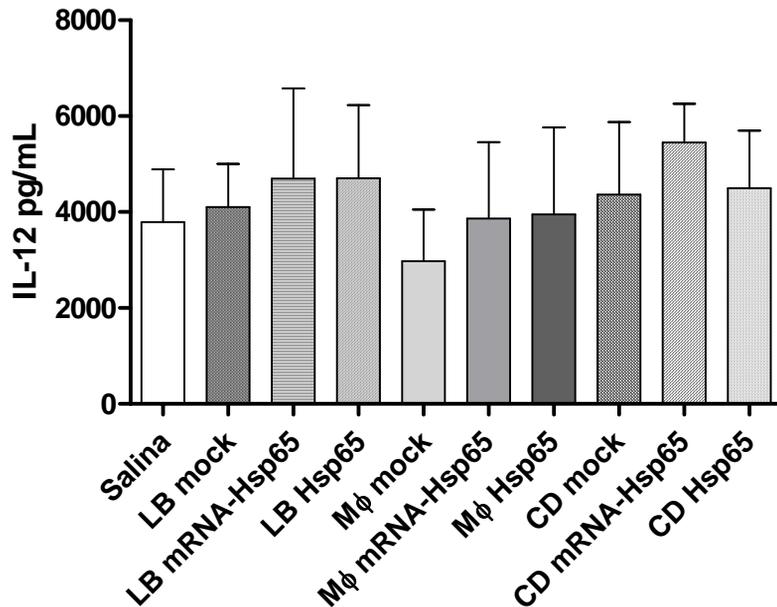


Figura 31. Níveis de IL-12 presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e tratados com as abordagens vacinais. . Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção receberam as abordagens terapêuticas: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a imunização os animais foram sacrificados tiveram os pulmões coletados e os níveis de IL-12 presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

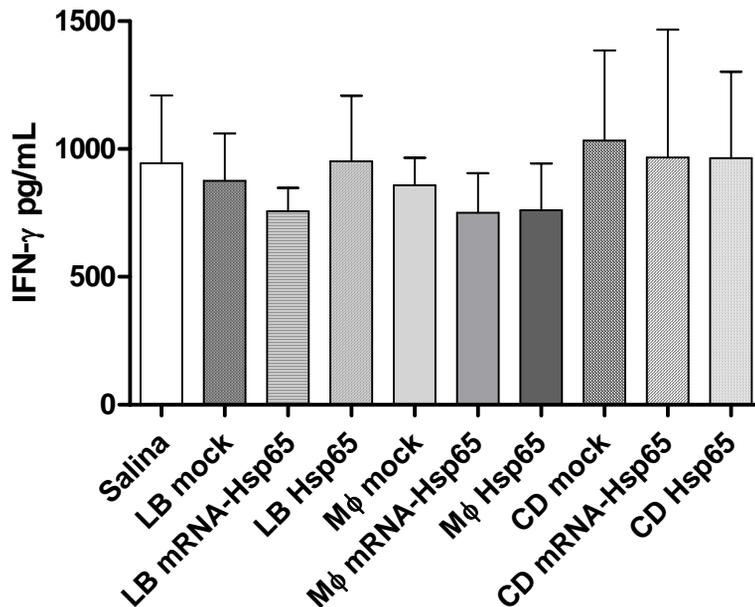


Figura 32. Níveis de IFN- γ presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e tratados com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção receberam as abordagens terapêuticas: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a imunização os animais foram sacrificados tiveram os pulmões coletados e os níveis de IFN- γ presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

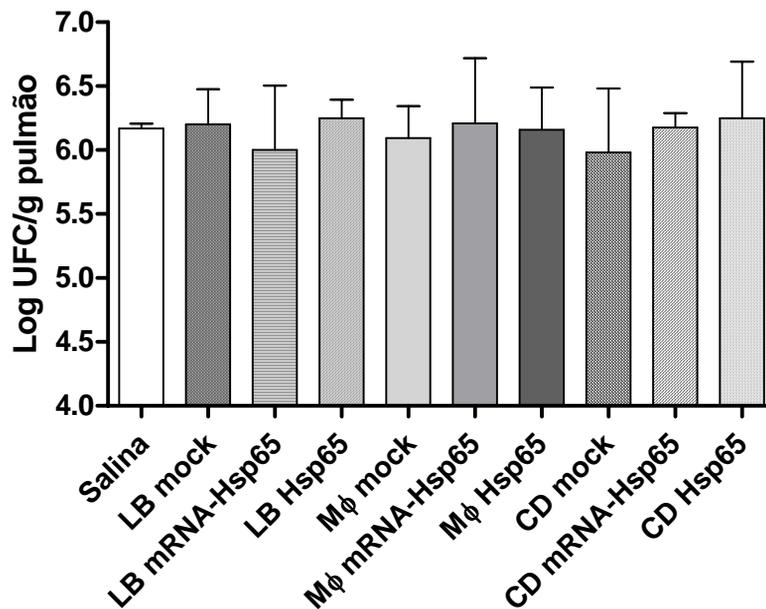


Figura 33. Quantificação das UFCs (Unidades Formadoras de Colônia) provenientes de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção os animais receberam as abordagens terapêuticas: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a imunização os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para a recuperação das unidades formadoras de colônia. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

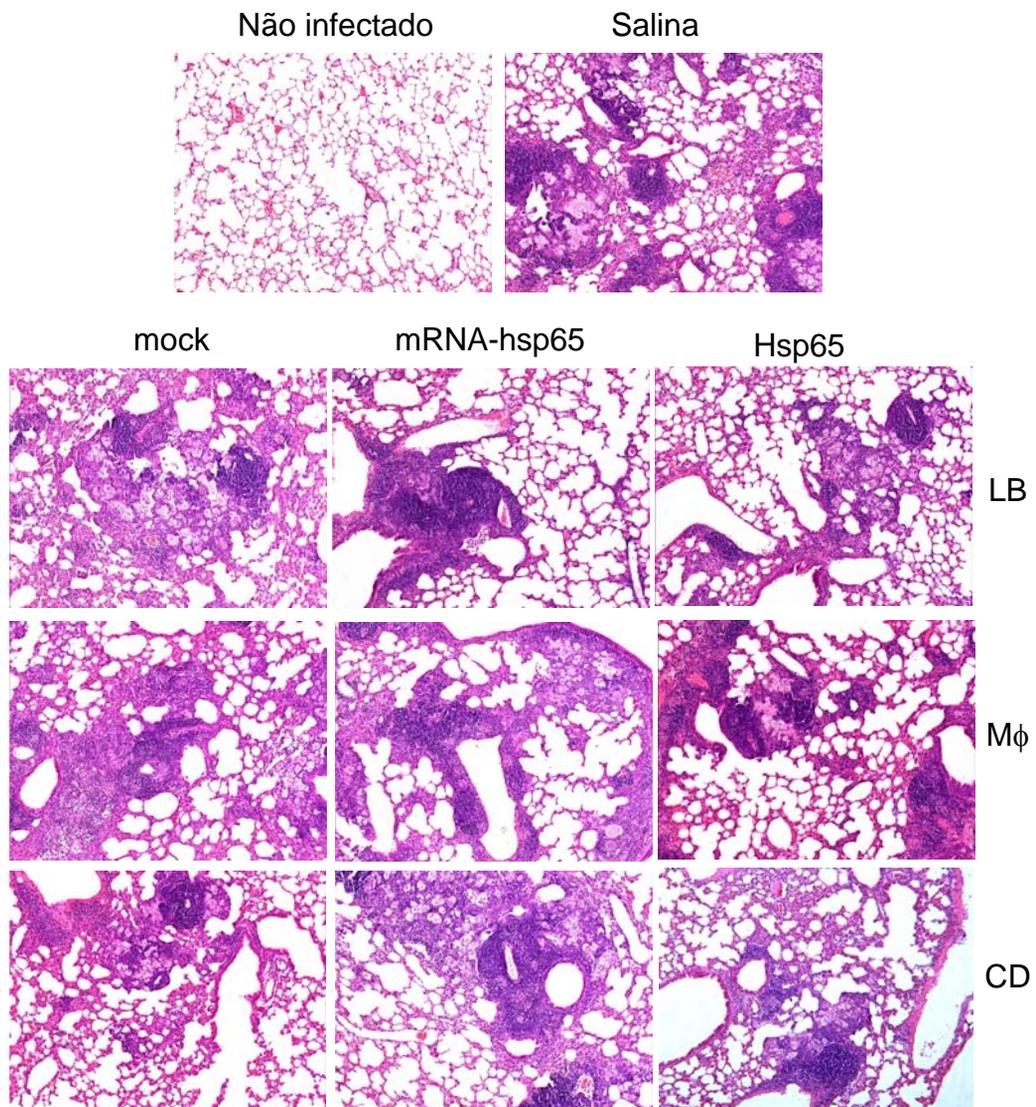


Figura 34. Cortes histológicas de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção os animais receberam as abordagens terapêuticas: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Trinta dias após a imunização os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. Tamanho original 40x. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

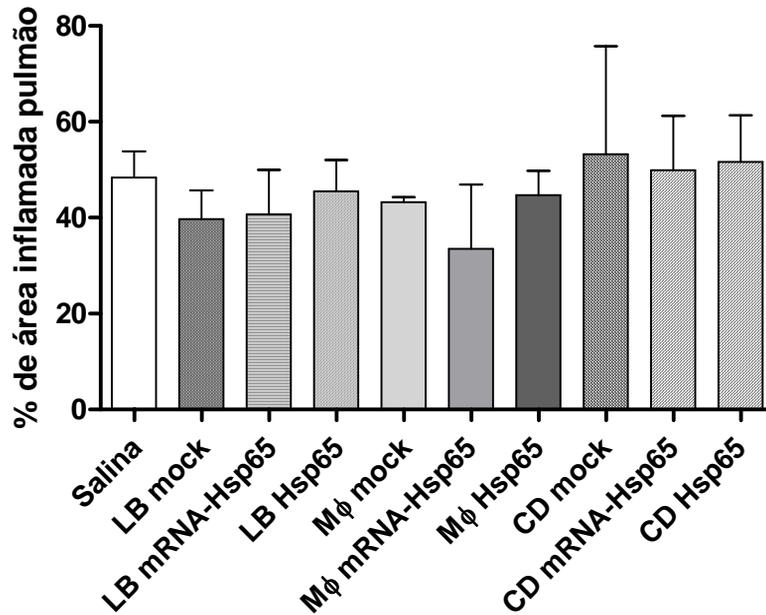


Figura 35. Análise morfométrica dos cortes histológicos de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção os animais receberam as abordagens terapêuticas: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina, i.v. Trinta dias após a imunização os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. A quantificação do infiltrado inflamatório realizada com o programa de análise de imagens Image J. Tamanho original 40x. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

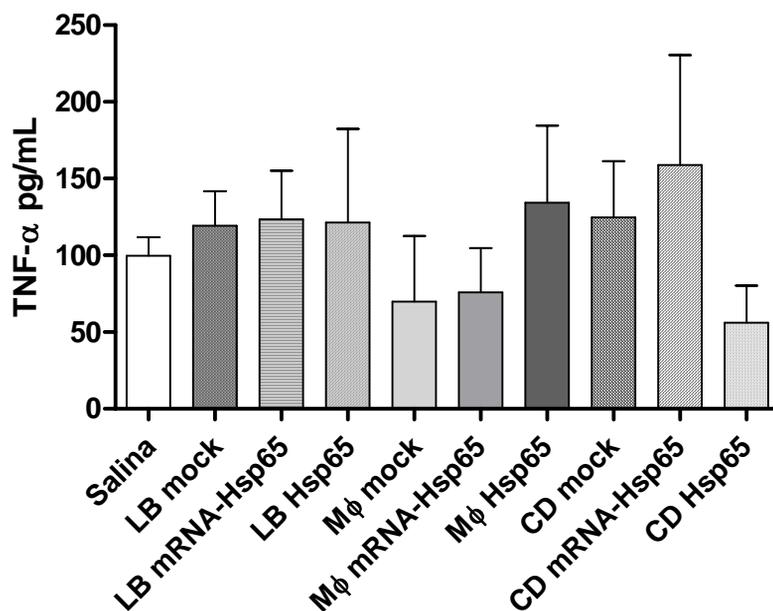


Figura 36. Níveis de TNF- α presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias após a última dose os pulmões foram coletados e os níveis de TNF- α presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

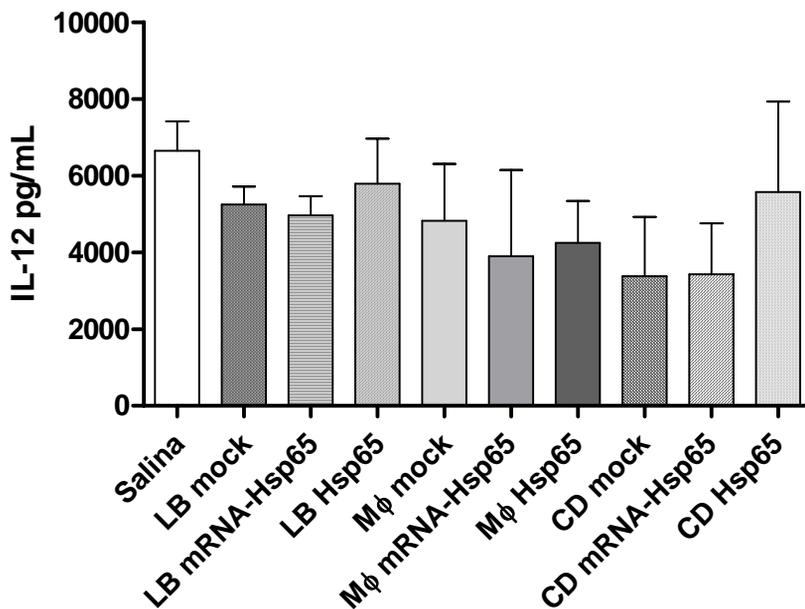


Figura 37. Níveis de IL-12 presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias após a última dose os pulmões foram coletados e os níveis de IL-12 presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

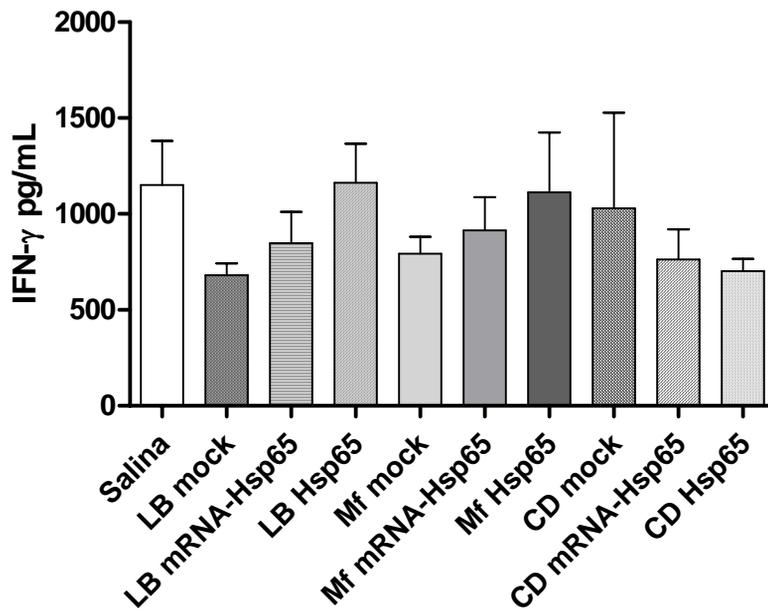


Figura 38. Níveis de IFN- γ presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias após a última dose os pulmões foram coletados e os níveis de IFN- γ presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

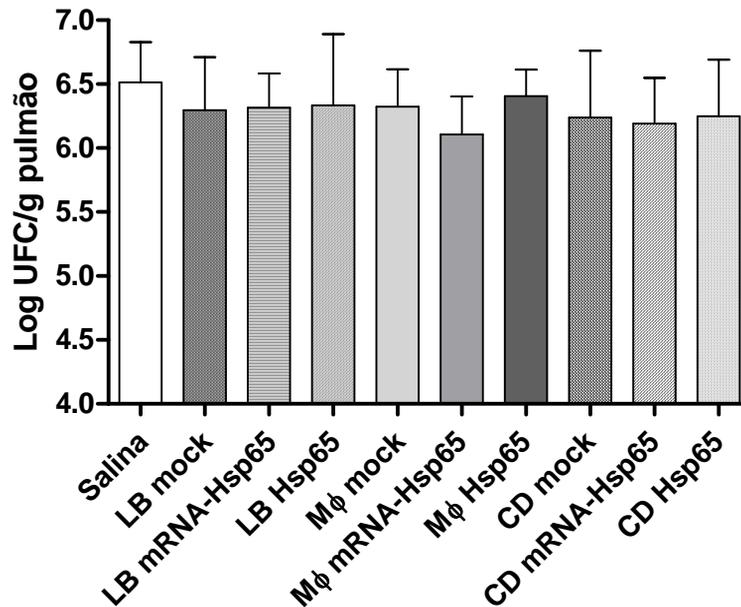


Figura 39. Quantificação das UFCs (Unidades Formadoras de Colônia) provenientes de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina, i.v. Quinze dias após a última dose os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para a recuperação das unidades formadoras de colônia. A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

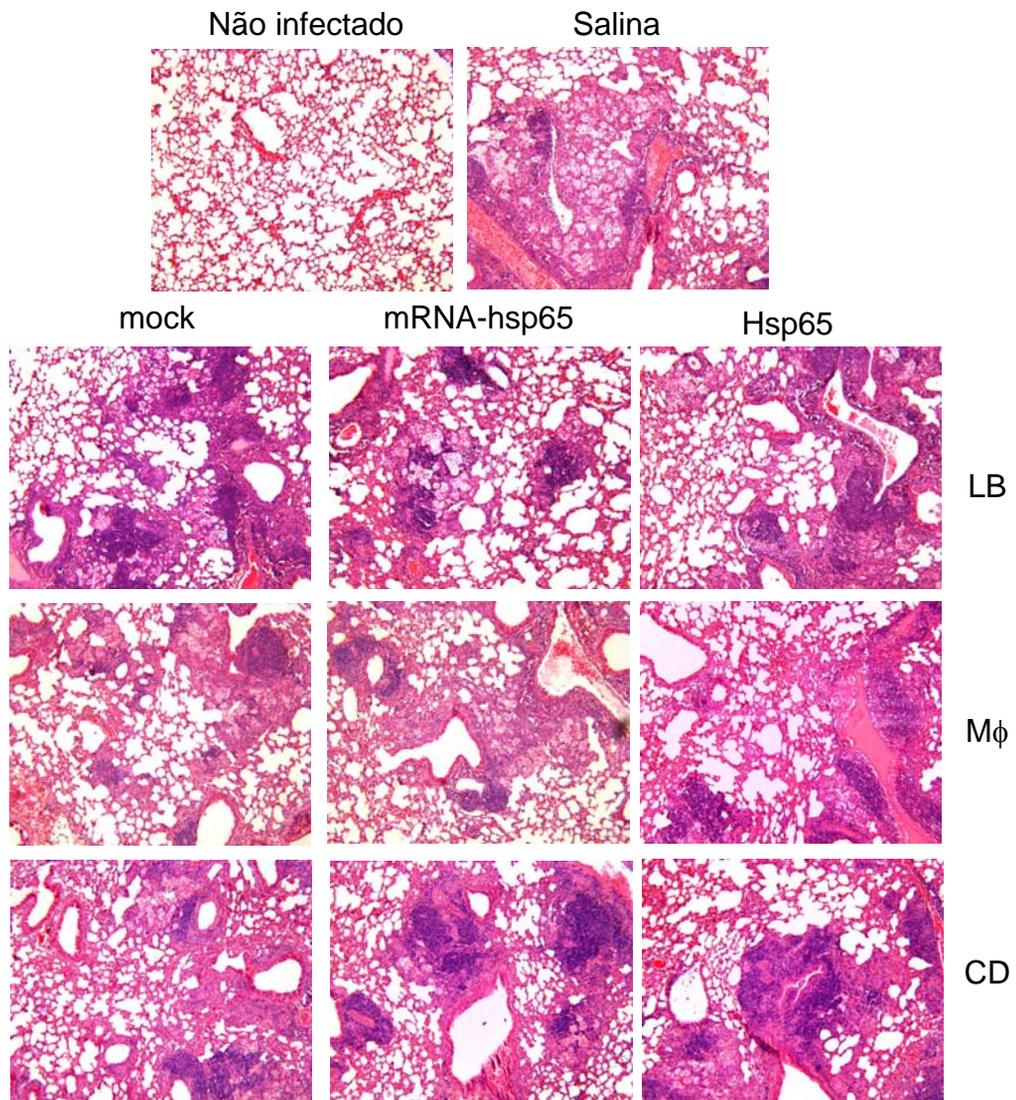


Figura 40. Cortes histológicos de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina, i.v. Quinze dias após a segunda doses os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. Tamanho original 40x. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

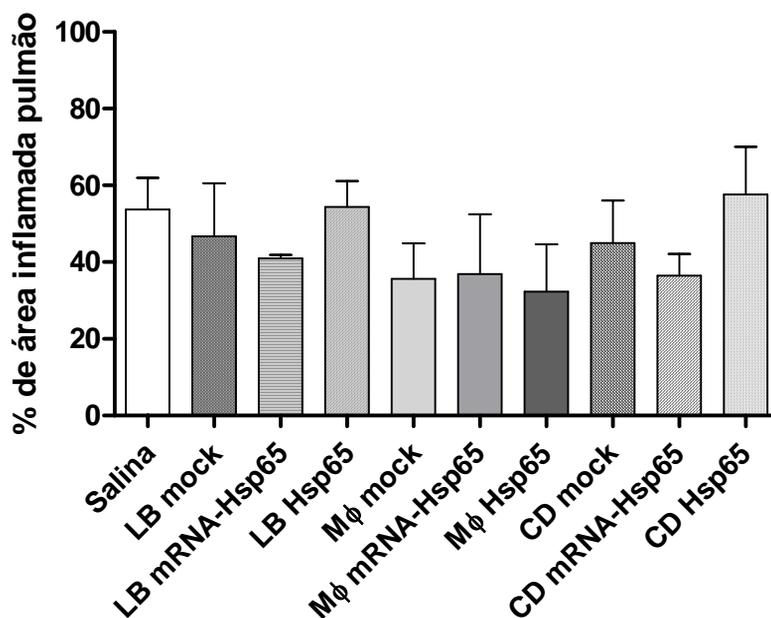


Figura 41. Análise morfométrica dos cortes histológicos de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina (i.v). Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs apenas eletroporadas (mock, i.v), APCs eletroporadas com mRNA-Hsp65 (i.v), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (i.v). O grupo controle recebeu salina, i.v. Quinze dias após a segunda doses os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. A quantificação do infiltrado inflamatório realizada com o programa de análise de imagens Image J. Tamanho original 40x. LB: linfócito B, Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: intravenoso; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

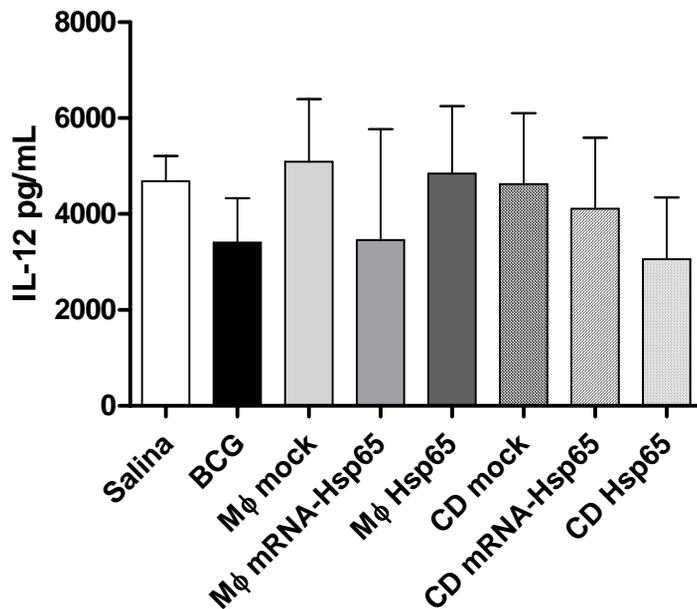


Figura 42. Níveis de IL-12 presentes no homogenato do pulmão de animais vacinados (2 doses) por via subcutânea e infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via (s.c). O grupo controle recebeu salina (s.c). Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). e salina (s.c). Quinze dias após a segunda doses os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os pulmões foram coletados e os níveis de IL-12 presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; s.c: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

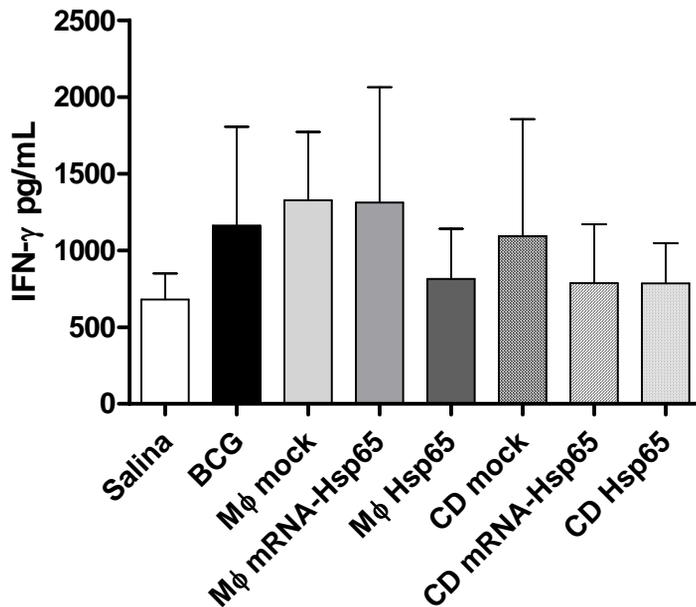


Figura 43. Níveis de IFN- γ presentes no homogenato do pulmão de animais vacinados (2 doses) por via subcutânea e infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados com as diferentes estratégias vacinais: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, s.c. Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c) e salina (s.c). Quinze dias após a segunda doses os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os pulmões foram coletados e os níveis de IFN- γ presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. M ϕ : macrófago; CD: célula dendrítica; s.c: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

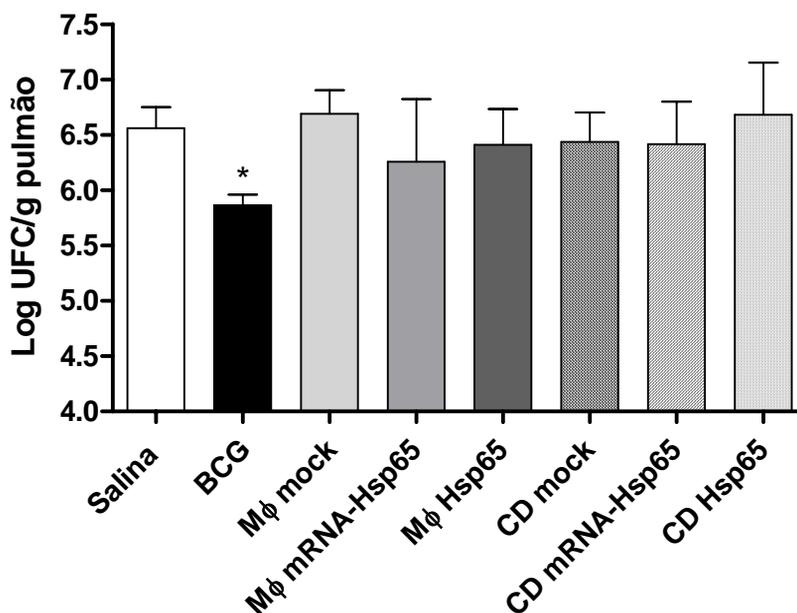


Figura 44. Quantificação das UFCs provenientes de pulmão de camundongos vacinados (2 doses) por via subcutânea e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, s.c. Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). e salina (s.c). Quinze dias após a segunda doses os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônia. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; s.c: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

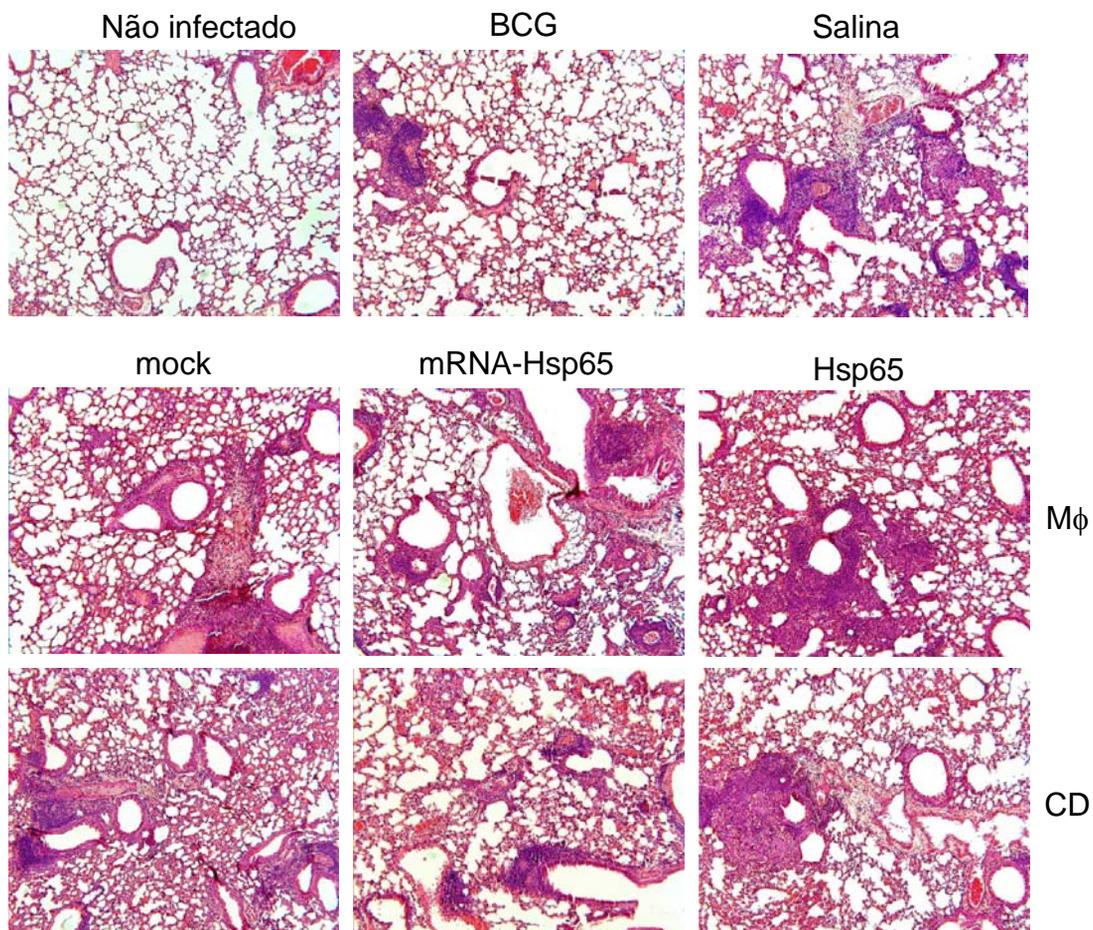


Figura 45. Cortes histológicas de pulmão de camundongos vacinados (2 doses) por via subcutânea e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, s.c. Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). e salina (s.c). Quinze dias após a segunda doses os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. Tamanho original 40x. Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; s.c: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

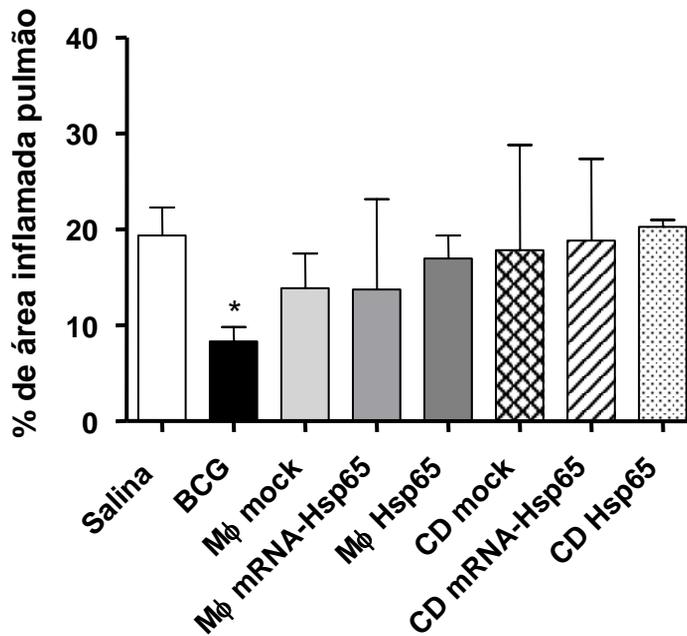


Figura 46. Análise morfométrica dos cortes histológicos de pulmão de camundongos vacinados (2 doses) por via subcutânea e desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos Balb/c foram imunizados as diferentes estratégias vacinais: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo BCG recebeu 1 dose de BCG (1×10^5 bacilos) por via s.c. O grupo controle recebeu salina, s.c. Após quinze dias receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c) e salina (s.c). Quinze dias após a segunda doses os animais foram desafiados com 1×10^5 bacilos da cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* por via i.n. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. A quantificação do infiltrado inflamatório realizada com o programa de análise de imagens Image J. Tamanho original 40x. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina e CD Hsp65. Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; s.c: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

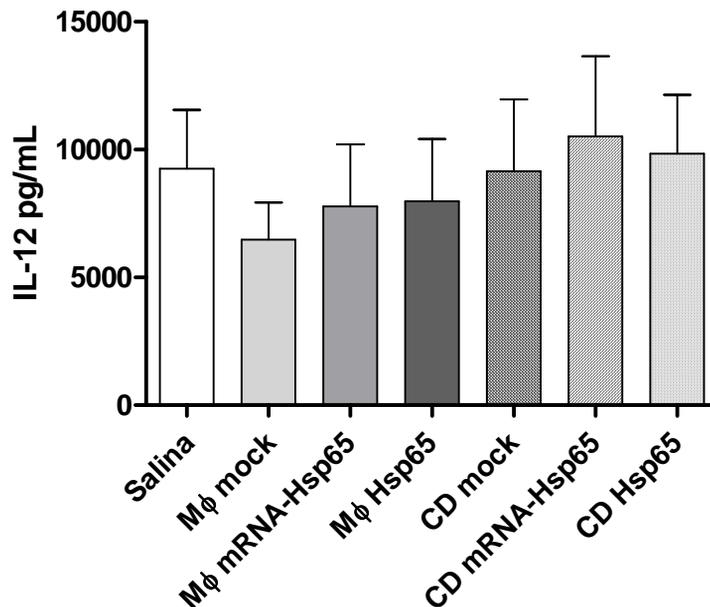


Figura 47. Níveis de IL-12 presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e tratados (2 doses) por via subcutânea com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção receberam as abordagens terapêuticas: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c. Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c. Quinze dias após a última dose os animais foram sacrificados tiveram os pulmões coletados e os níveis de IL-12 presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; s.c: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

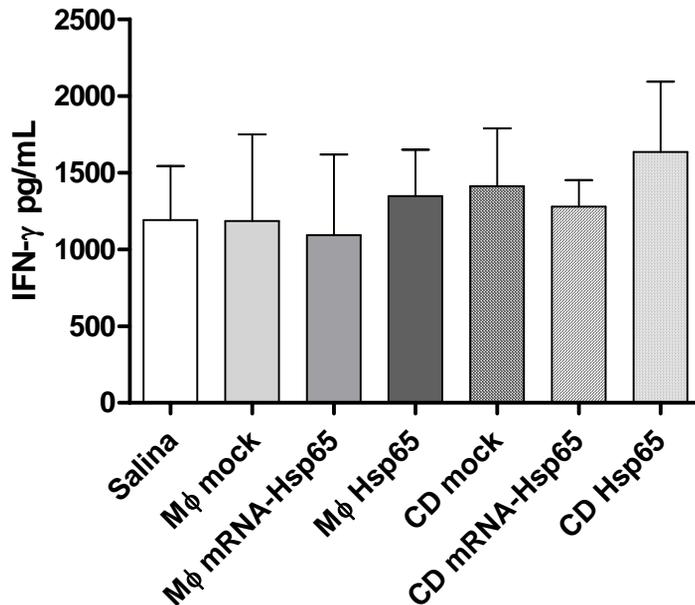


Figura 48. Níveis de IFN- γ presentes no homogenato do pulmão de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e tratados (2 doses) por via subcutânea com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via i.n e trinta dias após a infecção receberam as abordagens terapêuticas: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c. Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c Quinze dias após a última dose os animais foram sacrificados tiveram os pulmões coletados e os níveis de IFN- γ presentes no homogenato pulmonar foram dosados por meio de ensaio de ELISA. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). A redução foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo salina. Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; s.c: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 μ g; proteína Hsp65: 50 μ g.

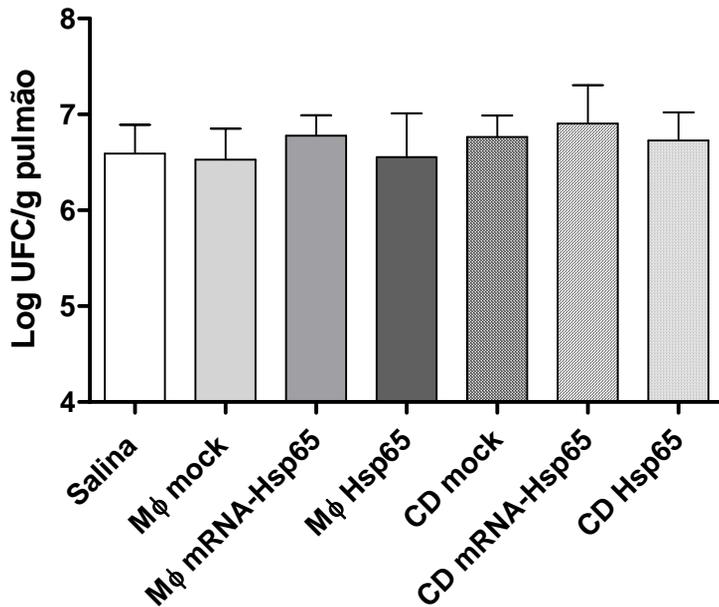


Figura 49. Quantificação das UFCs (Unidades Formadoras de Colônia) provenientes de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) por via subcutânea com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c. Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c. Quinze dias após a última dose os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para a recuperação das unidades formadoras de colônia. A redução foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo salina. Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

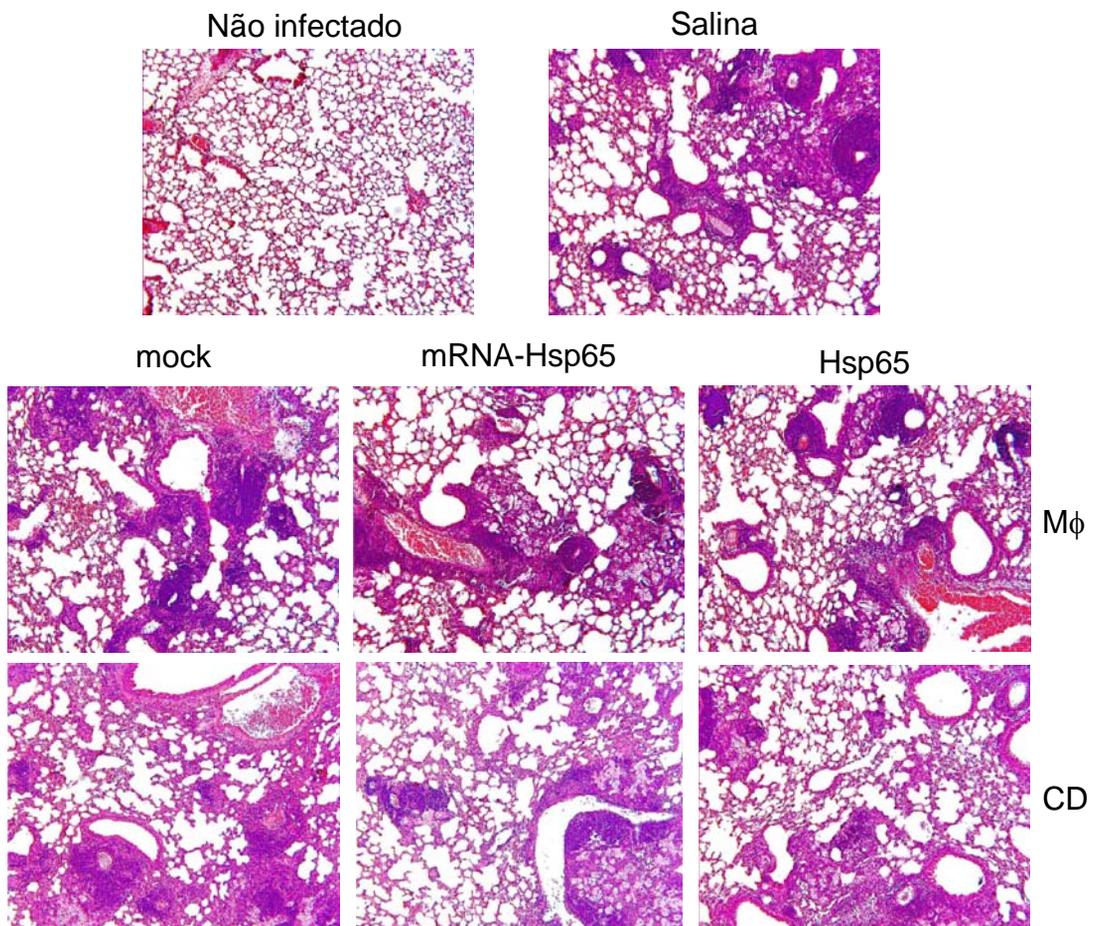


Figura 50. Cortes histológicos de pulmão de camundongos de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) por via subcutânea com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c. Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c. Quinze dias após a última dose os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. Tamanho original 40x. Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

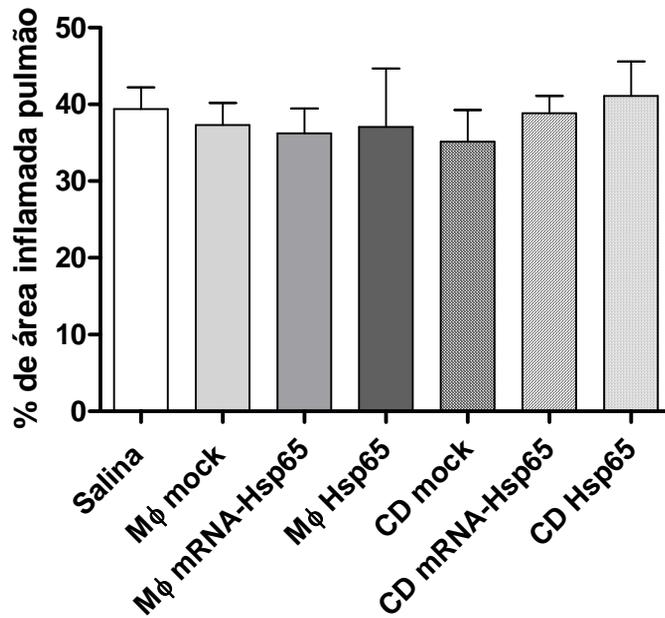


Figura 51. Análise morfométrica dos cortes histológicos de pulmão de camundongos de pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* seguido de tratamento (2 doses) por via subcutânea com as abordagens vacinais. Camundongos Balb/c foram infectados com *M. tuberculosis* por via intranasal e trinta dias após a infecção os animais receberam a primeira dose das diferentes abordagens vacinais: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c. Quinze dias depois receberam a segunda dose: APCs não pulsadas (mock, s.c), APCs pulsadas com mRNA-Hsp65 (s.c), APCs pulsadas com proteína Hsp65 (s.c). O grupo controle recebeu salina, s.c Quinze dias após a última dose os animais foram sacrificados e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes teciduais foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscópio óptico. A quantificação do infiltrado inflamatório realizada com o programa de análise de imagens Image J. Tamanho original 40x. Os resultados representam a média e desvio padrão do grupo (n=4). Mφ: macrófago; CD: célula dendrítica; i.v: subcutânea; i.n: intranasal; mRNA-Hsp65: 5 µg; proteína Hsp65: 50µg.

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](#)