LUÍS HENRIQUE FRANCO

**Papel dos leucotrienos na proteção conferida pela imunização
heteróloga BCG / DNA-HSP65 contra tuberculose**

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 Básica e Aplicada.

Orientadora:
Prof.^a. Dr.^a. Vânia Luiza Deperon Bonato

Co-orientadora:
Dr.^a. Alexandra Ivo de Medeiros

**RIBEIRÃO PRETO
2009**

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Modulação da Resposta Imune, localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP – USP (FAEPA)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP
- Núcleo de Pesquisas em Tuberculose (NPT)

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda a ciência e arte.”

Albert Einstein

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais
Vera Lúcia Oliveira Franco e Luís Roberto Franco,
os quais doaram toda sua vida, seu amor e seu trabalho,
formaram meu caráter e me ensinaram que
sonhar e realizar nossos sonhos só depende da nossa vontade.
Por vocês eu nunca desisti deste. Ele é só de vocês!

Meus agradecimentos são para:

A minha orientadora, **Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato**, por ter me acolhido desde o mestrado, por ter me transmitido uma pequena parte do seu vasto conhecimento de imunologia, pela paciência e compreensão, enfim, por ter contribuído direta ou indiretamente com meu crescimento pessoal e profissional;

A minha co-orientadora **Dra. Alexandra Ivo de Medeiros**, por ter compartilhado seus conhecimentos de imunologia e dos mediadores lipídicos;

Os professores **Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis**, **Dra. Patricia Torres Bozza**, **Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos** e **Dr. João Santana da Silva**, membros da banca examinadora, pela disponibilidade e participação na banca, assim como pelas sugestões para a finalização deste trabalho;

Os meus irmãos **Elaine Cristina Franco** e **Júlio Cesar Franco**, simplesmente por estarem comigo nesta vida;

A minha avó **Jesuína L. S. Franco** e minha tia **Nilda Franco**, por serem responsáveis por metade de tudo que sou hoje;

A **Dra. Lucia Helena Faccioli**, pela colaboração e contribuições dadas durante o desenvolvimento deste trabalho;

A **Dra. Camila Matias Peres**, por sempre ter estado disponível para discussão dos protocolos e resultados;

O **Dr. Carlos Arterio Sorgi**, pela realização dos ELISAs para dosagem de prostaglandinas e leucotrienos;

A **Dra. Simone Gusmão Ramos** e a técnica **Elaine Medeiros Floriano**, pelo auxílio nas análises histopatológicas;

O **Prof. Dr. Celio Lopes Silva** e **Profa. Dra. Arlete Aparecida Coelho-Castelo**, pela disponibilização dos laboratórios e infra-estrutura durante o desenvolvimento deste trabalho;

A **Prof. Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida** e a **Dra. Ana Cristina Leandro**, pelo apoio dado nos 2 meses que passei nos Estados Unidos e pelos conhecimentos que ganhei neste período;

A **Dra. Martha Maria de Oliveira**, por ter me recebido tão gentilmente no Rio de Janeiro durante os dias que lá passei, e pelos conhecimentos adquiridos durante aquele tempo;

Os irmãos e irmãs que ganhei nestes anos: **Ana Flávia Gembre**, **Cássia Alves Sérgio**, **Denise Moraes da Fonseca**, **Livia Campos**, **Marina Oliveira** e **Paula, Paola Fedatto**, **Pryscilla Fanini Wowk** e **Rubens Rodrigues dos Santos Júnior**. Muito mais que terem ajudado nos experimentos martirizantes na P3 ou fora dela, vocês me ofereceram momentos de muita alegria e de aprendizados valiosos, que levarei para sempre comigo.

As grandes e inesquecíveis amigas **Renata Sesti** e **Luciana Ruas**, por todos os momentos alegres que passamos e por todo apoio que vocês me deram durante a pós-graduação; o grande amigo **Allan Berlese**, pela maturidade e palavras amigas que, direta ou indiretamente, me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho; o **Breno Melo Lima**, que agora se tornou uma pessoa “*incancelabile*” e um amigão para toda hora; o **Sérgio Castanheira**, por todos os momentos alegres e divertidos;

As pessoas que, de perto ou de longe, me apoiaram, permitiram sonhar, fizeram rir ou chorar e ensinaram lições valiosíssimas: **Alessandra Mara Franzin** (☺), **Ana Clara Franco**, **Cláudia Polli** (☺), **Daiana Fernanda dos Santos**, **Daniela Dantas Moré** (☺), **Diana Mejido**, **Everton José**, **Eryka A. Enrique**, **Frederick Naert**, **Gisele Ganade**, **Gustavo M. Palomino**, **John Alves da Silva**, **Leila Vecchio**, **Márcia Andrade**, **Márcia Franco**, **Milton Júnior**, **Natália Franco Ferreira**, **Nikolas Lorencini**, **Patrícia Beatriz C. Simão**, **Renata Coelho** e **Rodrigo C. Otoni**;

Os queridos amigos dos laboratórios do Dr. Celio Lopes Silva e Dra. Arlete Aparecida Coelho-Castelo: **Patrícia Rodrigues M. Souza**, **Wendy Martin Rios**, **Rodrigo Ferracine Rodrigues**, **Carlos Rodrigo Zárate-Blades**, **Rogério Silva Rosada**, **Evanilda Ferreira da Silva**, **Everton Padilha**, **Thiago Malardo**, **Ricardo Luís Louzada**, **José Eduardo**, **Julio Cesar Lorenzi**, **Isabella Cardoso Fontoura**, **Luciana Previato de Almeida**, **Carolina Damas Rocha**. Também para a grande amiga **Ana Paula F. Trombone**. Obrigado pelo carinho e amizade de todos vocês!

Os **companheiros do LIIP** (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses);

As técnicas **Ana Flávia Gembre**, **Izaíra Tincani Brandão** e **Ana Paula Masson** por toda ajuda dada durante esse período;

O **Rogério Sousa de Carvalho**, pelo apoio na área de informática;

As técnicas **Sheila Batista Severino** e **Lucia Helena Pacheco**, pelos serviços prestados;

Todos os **técnicos e funcionários** do **Biotério Central da FMRP** e do **Biotério do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP**;

Todos os **docentes** do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada por todos os ensinamentos e pela excelência do Programa;

Todos os **amigos do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada**;

A secretária **Ana Cristine** e o secretário **Ronaldo Sordi Campanini**, pelo carinho e todo seu trabalho dedicado ao nosso Programa;

A **FAPESP**, **CAPES**, **CNPq** e **FAEPA** pelo suporte financeiro.

Índice Geral

Resumo	13
Abstract.....	15
1.Introdução	17
1.1. Tuberculose.....	18
1.2. Ativação da resposta imune na tuberculose	19
1.3. Mediadores lipídicos e resposta inflamatória.....	27
1.4. Mediadores lipídicos e proteção contra tuberculose	32
1.5. Desenvolvimento de novas vacinas contra tuberculose	34
2. Objetivos.....	40
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. <i>Material e métodos</i>	42
3.1. Animais.....	43
3.2. Obtenção da vacina DNA-HSP65 e do vetor pVAX	43
3.3. Análise do plasmídeo purificado	44
3.4. Bactérias.....	44
3.5. Imunizações	45
3.6. Preparação do inóculo de <i>M. tuberculosis</i> para infecção experimental	45
3.7. Infecção pulmonar com <i>M. tuberculosis</i> pela via intratraqueal (i.t.)	45
3.8. Tratamento com MK-886 - inibidor da síntese de leucotrienos.....	46
3.9. Tratamento com celecoxib - inibidor da síntese de prostaglandinas.....	46
3.10. Coleta, digestão, processamento e obtenção de células do pulmão	46
3.11. Coleta e obtenção de células do baço	47
3.12. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	47
3.13. Citometria de Fluxo	47
3.14. Preparação dos homogeneizados de pulmão para dosagem de citocinas e mediadores lipídicos.....	48
3.15. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas	49
3.16. Purificação e dosagem de LTB ₄ e PGE ₂	50
3.17. Detecção de nitrito.....	50
3.18. Histopatologia.....	51
3.19. Imunoistoquímica	51
3.20. Purificação de células CD4 ⁺ CD25 ⁺	52
3.21. Transferência de células Treg	53
3.22. Análise estatística	53
4. Resultados.....	54
4.1) Papel dos Leucotrienos (LT) na suscetibilidade à infecção por <i>M. tuberculosis</i>	55
Produção de LTB ₄ no pulmão de animais BALB/c e C57BL/6 infectados	55
Crescimento de <i>M. tuberculosis</i> nos pulmões e baços de animais BALB/c e C57BL/6 tratados com MK-886.....	57
Número absoluto de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos pulmões de animais BALB/c e C57BL/6 infectados e tratados com MK-886.....	59

Número absoluto de células CD11b ⁺ e CD11c ⁺ nos pulmões de animais BALB/c e C57BL/6 infectados e tratados com MK-886	62
4.2) Papel dos LT na proteção conferida por vacinas contra a tuberculose	65
Número de Unidades Formadoras de Colônia nos pulmões de animais imunizados ou não	65
Número de Unidades Formadoras de Colônia nos baços de animais imunizados ou não ...	70
Produção de mediadores lipídicos no pulmão de animais imunizados ou não	72
Avaliação histológica dos pulmões de animais imunizados ou não	73
Número absoluto de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos pulmões de animais WT ou 5-LO KO, imunizados ou não	84
Número de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no parênquima pulmonar de animais imunizados ou não, infectados e tratados com MK-886	87
Produção de nitrito nos pulmões de animais imunizados ou não	91
Produção de citocinas nos pulmões de animais imunizados ou não	94
Quantificação por imunoistoquímica de IFN- γ e IL-4 nos pulmões de animais imunizados ou não e tratados com MK-886.....	99
Análise do número e função supressora de células Treg de animais WT ou 5-LO KO imunizados	105
Papel das PG na expansão de células Treg e no efeito protetor induzido pela imunização com a estratégia <i>prime-boost</i>	108
Quantificação de células Foxp3 ⁺ por imunoistoquímica nos pulmões de animais tratados ou não com MK-886	114
5. Discussão	117
6. Conclusões	126
7. Bibliografia	128
8. Artigo para submissão	147

Índice de Figuras

Figura 1: Concentrações de LTB ₄ nos pulmões de animais BALB/c e C57BL/6 infectados por <i>M. tuberculosis</i>	56
Figura 2: Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos pulmões e baços de animais BALB/c e C57BL/6 infectados por <i>M. tuberculosis</i>	58
Figura 3: Número absoluto de células CD4 ⁺ e células CD8 ⁺ nos pulmões de animais BALB/c ou C57BL/6 infectados por <i>M. tuberculosis</i>	61
Figura 4: Número absoluto de células CD11b ⁺ e CD11c ⁺ nos pulmões de animais BALB/c ou C57BL/6 infectados por <i>M. tuberculosis</i>	64
Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais indicados nas figuras.	68
Figura 5: Número de UFC em pulmões de animais deficientes para 5-LO ou tratados com MK-886, imunizados ou não	69
Figura 6: Número de Unidades Formadoras de Colônia nos baços de animais imunizados ou não	70
Figura 7: Concentrações de leucotrieno B ₄ (LTB ₄) e prostaglandina E ₂ (PGE ₂) nos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO), imunizados ou não	73
Figura 8: Análise histológica dos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO), imunizados ou não (Aumento de 50x).	76
Figura 9: Análise histológica dos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO), imunizados ou não (Aumento de 400x).	78
Figura 10: Análise histológica dos pulmões de animais BALB/c imunizados ou não e tratados com MK-886 (Aumento de 50x).....	80
Figura 11: Análise histológica dos pulmões de animais BALB/c imunizados ou não e tratados com MK-886 (Aumento de 400x).....	82
Figura 12: Número absoluto de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos pulmões de animais WT ou 5-LO KO, imunizados ou não	84
Figura 13: Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de células CD4 ⁺ (figuras A-D) e CD8 ⁺ (figuras E-H) no parênquima pulmonar de animais BALB/c.	88
Figura 14: Número de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ detectadas por imunoistoquímica no parênquima pulmonar de animais BALB/c imunizados ou não pela estratégia <i>prime-boost</i> (PB) e tratados com MK-886.	90
Figura 15: Concentrações de nitrito nos pulmões de animais imunizados ou não pela estratégia <i>prime-boost</i> (PB) ou DNA-HSP65 (DNA).	93
Figura 16: Concentrações de citocinas nos pulmões de animais imunizados com a estratégia <i>prime-boost</i> (PB) ou DNA-HSP65 (DNA).	98
Figura 17: (A-H) Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de IFN- γ no parênquima pulmonar de animais BALB/c.....	101
Figura 18: (A-H) Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de IL-4 no parênquima pulmonar de animais BALB/c.....	103

Figura 19: Expressão de Foxp3 em células CD4 ⁺ CD25 ⁺ purificadas do baço de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO).	106
Figura 20: (A) Número total de células Treg obtidas dos baços de animais WT e 5-LO KO imunizados pela estratégia prime-boost.	107
Figura 21: Crescimento de <i>M. tuberculosis</i> em animais WT ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) imunizados com a estratégia <i>prime-boost</i> (PB) e tratados com celecoxib.	110
Figura 22: (A-H) Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de células Foxp3 ⁺ nos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) imunizados ou não.	112
Figura 23: (A-H) Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de células Foxp3 ⁺ no parênquima pulmonar de animais BALB/c.	115

Lista de Abreviaturas

5-LO – *5-lipoxygenase*

AA - *Ácido araquidônico*

AIDS - *Acquired immunodeficiency syndrome*

APC – *Antigen presenting cells*

BCG – *Bacilo de Calmette-Guérin*

CD – *Cluster Differentiation*

COX - *Cicloxygenase*

CpG - *Motivos de citocina e guanina não-metilados*

cPLA₂ - *Fosfolipase A₂ citosólica*

CR3 - *Complement Receptor 3*

CysLT – *Cys-leucotrieno*

DC-SIGN - *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*

DNA – *Ácido Desoxirribonucleico*

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EP - *E-prostanoid*

ESAT-6 - *Early secretory antigenic target – 6 kDa*

FDA – *Food and drug administration*

FITC – *Fluoresceína*

Foxp3 - *Forkhead box P3*

FSC – *Forward scatter*

GM-CSF - *Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*

HIV - *Human immunodeficiency virus*

IFN- γ – *Interferon- γ*

IgG – *Imunoglobulina G*

iNOS - *Inducible Nitric Oxide Synthase*

LAM - *Lipoarabinomana*

LT - *Leucotrienos*

ManLam - *Mannose-capped lipoarabinomannan*

MHC - *Major histocompatibility complex*

MIP-1 β - *Macrophage inflammatory protein-1 β*

MIP-2 - *Macrophage inflammatory protein-2*

MVA - *Modified vaccinia vírus Ankara*

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NF- κ B - *Nuclear factor- κ B*

NOD2 - *Nucleotide binding oligomerization domain*

OMS - *Organização Mundial da Saúde*

PBS - *phosphate buffered saline*

PerCP – *Peridinin Chlorophyll Protein*

PG – *Prostaglandinas*

PLGA - *Poly(lactic-co-glycolic acid)*

PPAR- γ - *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ*

PPD - *Purified protein derivate*

RANTES - *Regulated on activation, normal, T-cell expressed, and secreted*

RNA_m – *RNA mensageiro*

ROI - *Reactive oxigen intermediates*

SBF – *Soro Bovino Fetal*

SSC – *Side scatter*

SUS – *Sistema Único de Saúde*

TAP - *Transportador associado com processamento de antígenos*

TGF- β – *Transforming Growth Factor- β*

TLR - *Toll-like Receptors*

Treg – *Células T reguladoras*

UFC – *Unidades formadoras de colônia*

Resumo

A tuberculose é responsável por mais de 2 milhões de mortes ao ano. A imunidade protetora contra a tuberculose está relacionada com a ativação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ , citocina que potencializa os mecanismos microbicidas dos macrófagos para eliminação dos bacilos. Nos últimos anos, o leucotrieno B₄ (LTB₄) destacou-se como mediador lipídico que participa da imunidade protetora contra diversas infecções, incluindo a tuberculose. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel dos leucotrienos na proteção induzida pela imunização homóloga com DNA-HSP65 ou heteróloga com BCG/DNA-HSP65. Para isso, inicialmente, nós confirmamos a participação dos leucotrienos no controle da infecção por *M. tuberculosis* ao mostrar que animais C57BL/6, que controlam a replicação dos bacilos, secretam mais LTB₄; e ao bloquear a síntese de leucotrienos com a droga MK-886, estes animais ficaram suscetíveis à infecção. Em seguida, nós passamos a avaliar se os leucotrienos participavam da proteção conferida pela imunização homóloga com DNA-HSP65 ou heteróloga (*prime-boost*) com BCG/DNA-HSP65. Nossos resultados mostraram que animais deficientes para a síntese de LT (5-LO KO) infectados foram mais suscetíveis à infecção em relação aos animais WT. A maior suscetibilidade dos animais 5-LO KO foi associada à redução na secreção de IFN- γ , nitrito e IL-17, aumento na secreção de PGE₂, defeitos no recrutamento de células inflamatórias e aumento no influxo de células Foxp3⁺ para os pulmões. A imunização homóloga perdeu completamente seu efeito protetor na ausência de leucotrienos, enquanto a imunização heteróloga induziu proteção parcial. Animais 5-LO KO imunizados pelo esquema *prime-boost* secretaram concentrações mais elevadas de IL-17 e tiveram menor influxo de células Foxp3⁺ para os pulmões quando comparados aos animais 5-LO KO não imunizados e infectados. A inibição da síntese de prostaglandinas durante o protocolo de imunização pela estratégia *prime-boost* reduziu a capacidade protetora da vacina tanto em animais WT como nos 5-LO KO, sugerindo que as prostaglandinas podem desempenhar papel no processo de imunização. Em conjunto, nossos resultados reforçam a importância dos leucotrienos na imunidade protetora contra tuberculose, sugerindo sua atuação indireta, uma vez que, além de contribuírem para síntese de IFN- γ e nitrito, também parecem colaborar na síntese de IL-17.

Abstract

Tuberculosis is responsible for more than 2 millions of death for year. The immune response against tuberculosis is related to activation of IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ cells. IFN- γ increases the microbicidal mechanisms of macrophages to kill intracellular bacilli. Recently, the lipid mediator leukotriene B₄ (LTB₄) has been related to protection against several diseases, including tuberculosis. In this sense, the aim of this study was to evaluate the role of leukotrienes in the protection induced by homologous immunization with DNA-HSP65 or heterologous with BCG/DNA-HSP65 (prime-boost). Firstly, we confirmed the role of leukotrienes to control the replication of *M. tuberculosis* when we showed that C57BL/6 mice, which are able to contain bacilli growth, secreted high levels of LTB₄; and when we blocked leukotrienes synthesis by treatment with MK-886, C57BL/6 mice became more susceptible to infection. Then, we evaluated the role of leukotrienes in the protection induced by homologous or heterologous (prime-boost) immunization. Our data showed that animals deficient in leukotrienes synthesis (5-LO KO) infected with *M. tuberculosis* were more susceptible to infection than WT mice. The higher susceptibility of 5-LO KO was related to the decreasing of IFN- γ , nitrite and IL-17 production, increasing of PGE₂ secretion, defective recruitment of inflammatory cells and increased influx of Foxp3⁺ cells to the lungs. Homologous immunization has lost completely its protector effect in the absence of leukotrienes, while heterologous immunization induced only partial protection. Prime-boost-immunized 5-LO KO mice secreted higher levels of IL-17 and had lower influx of Foxp3⁺ cells to the lungs, when compared to non-immunized infected 5-LO KO. The abrogation of the synthesis of prostaglandins during the immunization by prime-boost reduced the protector effect of the vaccine either in WT and 5-LO KO mice, suggesting that prostaglandins may be important to the process of immunization. Together, our data reinforce the key role of leukotrienes in immune response against tuberculosis, suggesting that these lipid mediators may act indirectly to induce IFN- γ , nitrite and IL-17 synthesis.

1. Introdução

1.1. Tuberculose

A tuberculose é uma doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Geralmente, está relacionada à pobreza e afeta principalmente a população de adultos em fase produtiva. Apesar das estimativas indicarem que um terço da população mundial está infectado por esta bactéria, uma em cada 10 pessoas apresentará sintomas da doença ativa durante a vida. Embora o bacilo possua grande capacidade para infectar o homem, seu hospedeiro natural, o sistema imunológico é ativado e responde de modo que aproximadamente 90% dos indivíduos infectados apresentem a forma latente da infecção, permanecendo assintomáticos. Uma porcentagem pequena adoece, geralmente, em decorrência de reativação do foco infeccioso, que se acredita raramente esterilizar. Mesmo assim, a situação mundial da tuberculose é alarmante, pois no ano de 2005 ocorreram 8,8 milhões de novos casos de tuberculose, e 1,6 milhões de pessoas morreram em decorrência desta doença, o que corresponde a 4400 mortes por dia. Esta proporção aumenta entre as pessoas co-infectadas pelo HIV (*Human immunodeficiency virus*); aproximadamente 200 mil pessoas com AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome*) morrem de tuberculose por ano (1). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 22 países concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo. Nos últimos três anos, o Brasil passou da 14ª para a 16ª posição no ranking mundial da doença, segundo dados do último relatório da OMS. No Brasil, estimativas apontam que mais de 60 milhões de pessoas estejam infectadas pelo bacilo da tuberculose. Dados do Ministério da Saúde relatam que no Brasil são notificados 80 mil casos de tuberculose, com 5 mil óbitos anuais. No nosso país, a tuberculose é a quarta causa de morte por doenças infecciosas. A tuberculose é a nona causa de internações por doenças infecciosas, responsável pela sétima colocação em gastos com internação no Sistema Único de Saúde (SUS). Toda população brasileira tem direito ao diagnóstico e tratamento gratuitos no SUS (OMS).

M. tuberculosis é um bacilo intracelular facultativo de crescimento lento, não-móvel, gram-positivo e aeróbico (2, 3). Este bacilo apresenta uma parede celular de composição única devido à presença predominante de ácidos micólicos, contabilizando mais de 50% do peso seco da parede. É esta composição da parede celular que confere ao bacilo sua característica de álcool-ácido resistência, permitindo a retenção na sua parede de corantes básicos após a lavagem com solução de álcool-ácido (3). O genoma de *M. tuberculosis* apresenta tamanho de 4.41 Mb e contém aproximadamente 4000 genes, dos quais 52% codificam para proteínas com funções já descritas. Alguns genes também codificam 376 proteínas que não compartilham homologia com outras conhecidas e, portanto, são únicas do bacilo (4).

1.2. Ativação da resposta imune na tuberculose

Ao tossir, indivíduos infectados com tuberculose ativa liberam partículas de aerossol contendo bacilos viáveis, os quais podem ser inalados por outros indivíduos. Estas partículas alcançam as vias aéreas do hospedeiro, estabelecendo aí a infecção (5, 6). É descrito que as primeiras células presentes no local da infecção que interagem com o bacilo são os macrófagos alveolares e as células dendríticas (7, 8). A fagocitose de *M. tuberculosis* por estas células representa a ativação dos primeiros mecanismos de defesa da resposta inata, e também o início da ativação da resposta imune adaptativa. Diversos receptores de superfície de macrófagos e células dendríticas podem mediar a fagocitose e entrada de *M. tuberculosis* na célula, como por exemplo, receptores para imunoglobulina G (IgG), receptores para componentes do complemento, receptores para manose e proteínas surfactantes, receptor CD14 ou DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*) (9-11). O primeiro contato com o bacilo é um evento muito importante que pode influenciar na ativação da imunidade adaptativa, dependendo dos receptores envolvidos na captura dos bacilos. Por exemplo, a fagocitose de *M. tuberculosis* opsonizado por IgG via receptor expresso na superfície de macrófagos estimula a produção de intermediários do oxigênio reativo, além de possibilitar a fusão do fagossoma ao lisossoma (12), enquanto a fagocitose via receptor do complemento 3 ou CR3 (*Complement Receptor 3*) impede a ativação da cadeia respiratória e a maturação do fagossoma (13, 14). Já foi descrito também que a fagocitose de *M. tuberculosis* via receptor DC-SIGN é capaz de induzir a secreção de citocinas que regulam negativamente a resposta celular, como IL-10, favorecendo assim o crescimento do bacilo (11, 15).

Além de receptores para fagocitose, os macrófagos e as células dendríticas expressam também receptores relacionados com o reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões. Uma família destes receptores muito bem descrita é a dos receptores do tipo Toll ou TLR (*Toll-like Receptors*) (16). Componentes estruturais expressos por *M. tuberculosis* podem interagir com TLR, desencadeando a ativação da resposta imune (17). A ligação em TLR resulta em sinalização intracelular que culmina na translocação do fator de transcrição NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*) para o núcleo, levando à secreção de moléculas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e quimiocinas (MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein-1 β*) MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*) e RANTES (*regulated on activation, normal, T-cell expressed, and secreted*) (18). A interação de lipoarabinomana (LAM) presente no envelope micobacteriano

com os receptores TLR2 e TLR4 estimula a secreção de IL-12 por células dendríticas (19). Além disso, células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea também são ativadas por *M. tuberculosis* via TLR9 e produzem concentrações elevadas de IL-12 (20). Animais deficientes para MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), uma molécula sinalizadora comum para a maioria dos TLR, são altamente susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* (21). Outro estudo mostrou que a infecção de animais deficientes para MyD88 leva ao desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, porém, essa resposta não é suficiente para compensar a deficiência na imunidade inata, o que torna esses animais incapazes de controlar o crescimento do bacilo (22). Além disso, na ativação do sistema imune mediada pelos esses receptores, TLR9 e TLR2 podem atuar em conjunto para mediar resistência à infecção por *M. tuberculosis* (23).

Recentemente foi descrita também a participação do receptor citoplasmático NOD2 (*Nucleotide binding oligomerization domain*) no reconhecimento de *M. tuberculosis* (24). NOD2 é capaz de sinalizar tanto via NF- κ B quanto via inflamassoma / caspase 1 (25). É interessante destacar que somente *M. tuberculosis* vivo é capaz de induzir sinalização por meio deste receptor (24). Macrófagos e células dendríticas diferenciados de camundongos deficientes para NOD2 e infectados com *M. tuberculosis* apresentaram produção de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico reduzida. Porém, animais deficientes para NOD2 infectados por *M. tuberculosis* não foram mais suscetíveis à infecção em relação aos animais selvagens. Estes dados sugerem que o receptor NOD2 é importante no reconhecimento do bacilo por células da imunidade inata que podem exercer a função de apresentadoras de antígenos, embora não seja essencial para o controle da patogênese (26). Outro estudo recente que acompanhou a infecção experimental por *M. tuberculosis* por um período mais prolongado (6 meses) mostrou que camundongos deficientes para NOD2 apresentaram maior número de bacilos nos pulmões e morreram precocemente em relação aos selvagens (27). Em humanos, foi encontrada uma associação de polimorfismos no gene de NOD2 com manifestações clínicas da tuberculose (28).

Depois de fagocitar os bacilos, os macrófagos alveolares se tornam ativados e passam a secretar quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, induzindo o recrutamento de leucócitos para os pulmões. As células dendríticas, por sua vez, iniciam o processo de maturação e migram para os linfonodos do mediastino. Neste local, as células dendríticas já maduras apresentam antígenos micobacterianos na sua superfície para linfócitos T virgens, ativando assim a imunidade adaptativa (29). O papel dos macrófagos na infecção por *M. tuberculosis* já é bem estabelecido. Pelo fato destas células serem dotadas de um vasto arsenal microbicida, o papel mais importante destas células durante uma infecção micobacteriana é

restringir o crescimento dos bacilos intracelulares, evitando sua disseminação para outras células e órgãos (30). Para estudar o papel das células dendríticas na infecção por *M. tuberculosis*, diversos trabalhos mostraram que células dendríticas foram de fato infectadas *in vitro* pelo bacilo (31-33), e a infecção resultou na maturação destas células e na secreção de citocinas pró-inflamatórias (10, 33). Porém, evidências mostraram que as células dendríticas não foram capazes de restringir o crescimento intracelular de *M. tuberculosis* tão eficientemente quanto os macrófagos (31). Dessa forma, a função principal da célula dendrítica em infecções micobacterianas parece ser a de apresentação de antígenos e ativação da imunidade adaptativa.

Após a resposta imune inata inicial, a ativação da imunidade adaptativa promove um rápido controle da replicação do bacilo. Além disso, através da atividade da resposta adaptativa, desenvolve-se a resposta efetora e a memória imunológica necessárias para o controle do bacilo persistente e para a vigilância contra futuras re-infecções, respectivamente. A falha na imunidade inata e/ou adaptativa resulta no aparecimento dos sintomas clínicos da tuberculose (doença) e, conseqüentemente, na possível transmissão da bactéria para novos hospedeiros (34).

Os linfócitos T CD4⁺ são essenciais na imunidade protetora durante a infecção. A ativação destas células ocorre através da apresentação de antígenos micobacterianos associados às moléculas de classe II do MHC (*major histocompatibility complex*) (35). A importância destas células na imunidade protetora é refletida pela pandemia do HIV, a qual forneceu evidências diretas de que a diminuição no número e a perda da função dos linfócitos T CD4⁺ resultam em progressão da infecção primária, reativação de *M. tuberculosis* latente e aumento da suscetibilidade à re-infecção (36). Além disso, animais que não expressam o gene para o co-receptor CD4 ou não expressam moléculas de classe II do MHC foram todos altamente susceptíveis à infecção pelo bacilo (37, 38).

A importância dos linfócitos T CD8⁺ na tuberculose também foi estudada em modelos experimentais, nos quais a infecção de animais deficientes para expressão de $\beta 2$ microglobulina, para molécula TAP (transportador associado com processamento de antígenos), em CD8 α , em moléculas de classe I do MHC ou em perforina, resultou em maior susceptibilidade à infecção por *M. tuberculosis* em relação aos animais selvagens (39-42). Os mecanismos efetores desencadeados pela ativação das células T CD8⁺ parecem prolongar a sobrevivência de animais infectados, pois na sua ausência os camundongos tornavam-se mais suscetíveis à infecção (41, 43). Linfócitos T CD8⁺ também secretam IFN- γ (35) e sugere-se que estes linfócitos tenham a função de liberar as micobactérias do interior dos macrófagos

infectados, tanto pela via que envolve a exocitose de grânulos como perforina e granulinsina (44-46), quanto pela via que requer a ligação de CD95 (47).

Depois de serem infectados por *M. tuberculosis*, os macrófagos podem sofrer apoptose e liberar vesículas apoptóticas contendo antígenos micobacterianos, que por sua vez, são fagocitadas por células dendríticas não infectadas. Ao capturarem as vesículas apoptóticas, as células dendríticas apresentam os antígenos micobacterianos via moléculas de classe I do MHC e CD1b, permitindo que os linfócitos T CD8 e células NKT reconheçam tanto antígenos protéicos quanto glicolipídeos (48-50).

A interação das populações de linfócitos com macrófagos ou células dendríticas, decorrente da indução da resposta inflamatória resulta na formação de uma estrutura característica de infecções crônicas como a tuberculose, denominada granuloma. O granuloma é definido como um acúmulo local de células mononucleares formando uma estrutura organizada com macrófagos, diferenciados em células epitelióides, localizados ao centro, e envolvidos por uma camada de linfócitos periféricos. Sua formação é promovida pela produção de citocinas, principalmente IFN- γ e TNF e tem por finalidade concentrar e intensificar o contato das células T com os macrófagos infectados, permitindo uma cooperação imprescindível para uma defesa antimicrobiana efetiva (51). Além disso, o granuloma limita o ambiente tóxico, protegendo o tecido alveolar das proximidades, ao mesmo tempo em que dificulta a disseminação da bactéria no restante do pulmão (52). Por outro lado, essa formação destrói o tecido adjacente e pode levar à necrose da região central, o que acarretaria na formação de uma cavidade com perda funcional. Dentro dos granulomas, existe um balanço entre sobrevivência e morte dos bacilos (52). Egen e colaboradores descreveram recentemente que os linfócitos T presentes em granulomas hepáticos formados após infecção intravenosa com BCG estão em constante movimento, circulando por toda área da lesão e mantendo contato direto com a maioria dos macrófagos (53). Outros autores demonstraram também que linfócitos T ativados entram e saem constantemente do granuloma, sugerindo que este funcionaria como um órgão linfóide terciário (54). Esses estudos suportam a idéia de que o granuloma não é somente uma simples barreira pra conter o bacilo. Em humanos, um estudo sugeriu que a estrutura clássica do granuloma, com uma área necrótica rodeada por uma camada de células, não é o foco da interação entre patógeno e hospedeiro, mas representaria “um campo de batalha abandonado” (55). Além disso, a atividade proliferativa e a produção de citocinas são observadas principalmente na parte externa dessa estrutura, e não na interface da camada celular e necrose (55, 56).

Em relação à imunidade humoral, os linfócitos B e os anticorpos não são considerados essenciais na proteção contra tuberculose (57, 58). Porém, os linfócitos B estão presentes em

grande número nos granulomas (59). Animais deficientes de linfócitos B recrutam menos linfócitos T para o pulmão, apesar de não ficarem mais suscetíveis à infecção, o que sugere que estas células podem contribuir para o recrutamento celular e formação do granuloma, (60).

Além dos macrófagos, células dendríticas e linfócitos, os mastócitos também podem participar na imunidade contra *M. tuberculosis*. Animais infectados com *M. tuberculosis* e tratados com C48/80, uma droga que ativa a desgranulação dos mastócitos, apresentaram aumento no número de bacilos no pulmão e também redução da reação inflamatória (61).

Outro subtipo celular que atualmente apresenta papel em destaque nas doenças infecciosas são as células T reguladoras (Treg) (62). As Treg representam de 5 a 10% da população de células T CD4⁺ e são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Foxp3 (*forkhead box P3*) e pela alta expressão da molécula CD25 (63). Estas células apresentam o papel de regular negativamente a resposta imune durante os processos de erradicação do patógeno, impedindo a exacerbação da patologia. Este é um mecanismo benéfico para o hospedeiro em infecções agudas, tornando-se, entretanto, um problema em infecções crônicas, onde há persistência do patógeno (64).

Os primeiros trabalhos a correlacionar a função efetora das células Treg com tuberculose foram realizados com células de pacientes com a doença ativa (65, 66). Pacientes recém diagnosticados com tuberculose apresentaram número de células CD4⁺CD25^{high} ou CD4⁺Foxp3⁺ periféricas 3 vezes maior em relação àquelas detectadas em indivíduos saudáveis com prova tuberculínica positiva (PPD⁺) (65). Além disso, a estimulação de células mononucleares de sangue periférico destes pacientes com proteínas secretadas por *M. tuberculosis* em presença de células CD4⁺CD25⁺ resultou em redução na secreção de IFN- γ . Quando as células Treg foram eliminadas destas culturas e as remanescentes foram estimuladas com proteínas secretadas por *M. tuberculosis*, observou-se maior produção de IFN- γ em relação às culturas em que as células Treg não foram eliminadas (66). O aumento no número de células Treg também foi observado no sítio da infecção (66, 67). Ainda, células mononucleares de sangue periférico obtidas de indivíduos com tuberculose latente, e não de indivíduos saudáveis, cultivadas em presença de BCG e TGF- β , apresentaram expansão de células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, as quais foram caracterizadas funcionalmente como células Treg (68). Li e colaboradores 2008 descreveram que a produção de IFN- γ por células T $\gamma\delta$ após estimulação com ESAT-6 (*early secretory antigenic target – 6 kDa*) foi suprimida na presença de células T reguladoras (69).

No que se refere aos modelos experimentais, Quinn e colaboradores mostraram que a eliminação ou inativação de células $CD25^+$ em camundongos 3 dias antes da infecção por BCG ou *M. tuberculosis* induziu um aumento na secreção de $IFN-\gamma$ sem, no entanto, promover uma eliminação mais eficiente do bacilo (70). A transferência concomitante de células $CD4^+CD25^+$ e de células $CD4^+CD25^-$ para animais, infectados um dia após a transferência, inibiu a proteção mediada pela produção de $IFN-\gamma$ obtida na transferência somente de células $CD4^+CD25^-$ (64). Scott-Browne e colaboradores observaram que a eliminação de células $Foxp3^+$ induziu aumento na frequência de células produtoras de $IFN-\gamma$ e redução no número de bacilos no pulmão. Essa proteção foi independente de IL-10 (71). Por fim, Mason e colaboradores observaram a presença de células $CD4^+CD25^+$ produtoras de IL-10 e TGF- β no pulmão de animais com 35 dias de infecção e sugeriram que a citocina TGF- β pode estar envolvida na supressão mediada por células T reg (72).

Foi descrito recentemente um novo subtipo de linfócito T auxiliar com funções inflamatórias conhecido como linfócito Th17 (73). Para que ocorra a diferenciação das células Th17 em camundongos, é necessário que haja no microambiente a presença de TGF- β e IL-6. Em humanos, além do TGF- β e IL-6, a presença de IL-1 β e IL-23 é necessária para a diferenciação de células Th17 (74). Uma vez ativadas, as células Th17 secretam IL-17, IL-21, IL-22 e IL-6 (75). Em 2006, foi demonstrado que animais deficientes para síntese de $IFN-\gamma$ e infectados com BCG apresentaram aumento na frequência de células produtoras de IL-17 (76). Além disso, células dendríticas derivadas de medula óssea infectadas com BCG e estimuladas com $IFN-\gamma$ exógeno regularam positivamente a expressão de IL-12 e negativamente a expressão de IL-23, com conseqüente redução na frequência de células produtoras de IL-17 (76). Em conjunto estes dados mostram que durante uma infecção micobacteriana há indução tanto de células produtoras de $IFN-\gamma$ quanto de IL-17. Entretanto, a produção de $IFN-\gamma$ limita a população de células IL-17 $^+$, fator que pode estar associado à regulação da patologia (76). Umemura e colaboradores descreveram que a IL-17 poderia ser importante no recrutamento inicial de neutrófilos, assim como na produção de $IFN-\gamma$ mediada por células T e também na formação do granuloma através da indução da produção de quimiocinas (77).

Além das populações celulares descritas acima, citocinas como $IFN-\gamma$, IL-12 e TNF- α (40, 78-80) estão associadas à resposta protetora, enquanto citocinas como IL-4 e IL-10 dificultam o controle da infecção (81).

O $IFN-\gamma$ é a principal molécula ativadora de macrófagos e, junto com TNF- α , estimula a produção de óxido nítrico sintase induzível ou iNOS (*inducible Nitric Oxide*

Synthase) e intermediários reativos do oxigênio ou ROI (*Reactive oxygen intermediates*), os quais, em camundongos, apresentam uma atividade microbicida contra *M. tuberculosis* (82-84). A infecção de camundongos deficientes para IFN- γ leva ao desenvolvimento de uma doença mais grave e a um aumento na mortalidade em relação aos animais selvagens (78, 79, 85). Embora IFN- γ ainda seja considerado o melhor parâmetro para se correlacionar proteção, concentrações elevadas dessa citocina não necessariamente significam melhor proteção na tuberculose experimental (86).

Gutierrez e colaboradores mostraram que a proteção mediada por IFN- γ é um processo dependente de autofagia (87). Essa citocina atua em macrófagos induzindo a expressão de iNOS e Irgm-1 (*Immunity related p47 guanosine triphosphatase*). Este último é um membro da família de GTP (guanosina trifosfato) de 47 kDa induzido por IFN- γ e está associado à indução da formação de autofagossoma em macrófagos ativados. Esse processo facilitaria a maturação do fagossoma, permitiria sua fusão com o lisossoma e a conseqüente morte do bacilo (87, 88). Atuando de maneira paralela, a enzima iNOS, também expressa em macrófagos ativados, gera intermediários reativos do nitrogênio, que podem matar a bactéria diretamente ou inativar o fator de virulência do *M. tuberculosis* denominado dimicolato de trealose (TDM; *trehalose 6,6'-dimycolate*), que retarda a maturação do fagossoma. Sendo assim, a ausência desse fator facilita a morte do bacilo pela formação do fagolisossoma (89). Dessa forma, a autofagia, originalmente definida como um processo celular homeostático está emergindo como um poderoso maquinário das células da imunidade inata para defesa do hospedeiro.

Além de IFN- γ , animais deficientes para as citocinas IL-12 e TNF- α também foram altamente suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis* (40, 90). Indivíduos que apresentam expressão deficiente de receptores para IFN- γ ou para IL-12 parecem ser mais suscetíveis às infecções micobacterianas (91-93), e pacientes com artrite reumatóide tratados com anticorpos contra TNF- α também se mostraram mais susceptíveis a estas infecções (94).

Com relação às citocinas associadas à falta de proteção, foi descrito que animais deficientes para IL-4 apresentavam redução no número de bacilos nos pulmões e aumento na expressão de RNA mensageiro para IFN- γ e TNF- α , assim como diminuição de RNAm para TGF- β em relação aos animais selvagens (95). Além disso, parece que em presença da IL-4, o TNF- α desempenha função tóxica, caracterizada pela exacerbação da resposta de hipersensibilidade do tipo IV, ou seja, da resposta inflamatória mediada por células mononucleares (95, 96). Na tuberculose humana já foram documentadas evidências de que o

aumento na expressão de IL-4 está relacionado com a gravidade da doença e a ocorrência de cavitação (97).

O papel da IL-10 na tuberculose ainda é controverso. Diversos trabalhos mostraram que a progressão da infecção foi similar entre animais normais e deficientes para IL-10 (98-100). Entretanto, animais transgênicos para IL-10 foram mais susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* (101). Em camundongos da linhagem C57BL/6, a presença de IL-10 parece não comprometer o controle da infecção. Entretanto, nos animais BALB/c, foi observado um aumento nas concentrações de IL-10 na fase tardia que pode comprometer as funções mediadas por IFN- γ , uma vez que esses animais não controlam a infecção nesse período (102).

A IL-24, uma citocina da família da IL-10 descrita recentemente, está associada à supressão do crescimento tumoral e às funções pró-inflamatórias (103). Recém nascidos vacinados com BCG mostraram aumento na expressão do RNAm para IL-24 (104). O mesmo foi observado em primatas não humanos vacinados também com BCG (105). Após estimulação com ESAT-6, células de pacientes com tuberculose ativa reduziram a expressão de IL-24 em relação às células de indivíduos com tuberculose latente (106). Com base nestes dados, células mononucleares de pacientes com tuberculose foram estimuladas com ESAT-6 em presença de IL-24 exógena. Os dados de expressão gênica revelaram aumento nas concentrações de RNAm para IL-12 α , IL-12 β , IL-23 α e IL-27. Quando foi adicionado às culturas um anticorpo neutralizador de IL-24, a expressão de IFN- γ foi inibida. Estes dados sugerem que IL-24 induz a secreção de IL-12, sendo esta via de ativação necessária para a síntese de IFN- γ (107).

Outra citocina, desta vez pertencente à família da IL-12, que tem uma participação relevante na imunidade contra *M. tuberculosis* é a IL-27. Descrita inicialmente como uma citocina reguladora capaz de aumentar a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 *naïve*, a IL-27 é produzida por macrófagos e células dendríticas (108). Estudos *in vitro* indicaram que a sinalização pelo receptor dessa citocina em células CD4⁺ ativa o fator de transcrição *T-bet*, sugerindo que IL-27 sensibiliza esses linfócitos para a diferenciação para o padrão Th1 induzida por IL-12 (109). Camundongos deficientes para o receptor de IL-27 eliminam o bacilo mais rapidamente do que animais selvagens através do aumento da secreção de IL-12 e IFN- γ , o qual aumenta o potencial microbicida de macrófagos. Apesar da maior eliminação dos bacilos, a intensa resposta inflamatória gerada por estes animais induz morte prematura (110).

1.3. Mediadores lipídicos e resposta inflamatória

Os mediadores lipídicos, como os leucotrienos (LT) e as prostaglandinas (PG), são sintetizados por vários tipos celulares do organismo e possuem papéis fisiológicos e inflamatórios fundamentais para a homeostasia e proteção contra infecções, respectivamente. Além disso, estes mediadores podem agravar patologias inflamatórias como asma, artrite reumatóide, aterosclerose, doenças periodontais, dentre outras [(Revisado por (111-113))].

Durante respostas inflamatórias, a produção dos mediadores lipídicos por leucócitos é estimulada mediante contato com patógenos, citocinas e fatores de crescimento. Estes estímulos induzem o aumento das concentrações de cálcio intracelular, resultando na translocação da fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) para as membranas do retículo endoplasmático e do núcleo. Este processo culmina na liberação do ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídeos de membranas, podendo resultar na síntese de LT e PG. Além disso, é descrito ainda que a síntese de mediadores lipídicos possa ocorrer no interior de organelas denominadas adipossomas ou corpúsculos lipídicos. Os corpúsculos lipídicos representam um estoque intracelular de diversos tipos de proteínas, como citocinas e quimiocinas, e aquelas envolvidas com o metabolismo de lipídeos. Estas organelas apresentam também cPLA₂, AA livre e diversas enzimas envolvidas no metabolismo de AA, o que as caracteriza como sítios ativos de produção de mediadores lipídicos [(Revisador por (114))]. Os LT e as PG, assim como todos os outros metabólitos ativos derivados do AA, são chamados coletivamente de eicosanóides.

As PG são derivadas do metabolismo do AA pelas enzimas cicloxigenases (COX). Os produtos ativos derivados do AA pela ação dessas enzimas são chamados coletivamente de prostanóides (113). São descritas duas isoformas de COX: COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente por praticamente todos os tipos celulares do organismo, enquanto a COX-2 é expressa apenas por células que receberam estímulos inflamatórios e em células do cérebro e rins. De acordo com essa expressão diferencial, sugere-se que a COX-1 seja responsável pela produção basal dos prostanóides relacionados com processos fisiológicos e a COX-2 pelo aumento dos prostanóides durante a inflamação e injúria tecidual (115, 116). Logo após a liberação do AA dos fosfolipídeos de membrana, as enzimas COX-1 ou COX-2 catalisam uma reação de dois passos que converte AA em PGH₂, um composto instável [(Revisado por (117))]. PGH₂ é convertida por diversas PG-sintases em uma série de produtos biologicamente ativos, incluindo PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α} e tromboxana A₂ (TXA₂) (118).

Algumas drogas antiinflamatórias, como glicocorticóides, são capazes de inibir a transcrição da COX-2 (119). As drogas antiinflamatórias não-esteroidais também podem inibir a atividade da COX, bloqueando assim a síntese dos prostanóides. Porém, esta classe

de drogas apresenta fortes efeitos colaterais sobre o trato gastrointestinal, uma vez que sua atuação não é seletiva entre as enzimas COX-1 (fisiológica) e COX-2 (inflamatória). Atualmente, são comercializados os inibidores específicos para COX-2, conhecidos como *coxibs*. Estes apresentam efeitos colaterais mínimos sobre o trato gastrointestinal (113).

Uma das prostaglandinas mais conhecidas e bem estudadas é a PGE₂. Ela é produzida por uma série de células do organismo, incluindo fibroblastos, macrófagos e alguns tipos de células tumorais. A PGE₂ exerce sua ação através da ligação com um ou mais dos seus quatro receptores específicos acoplados à proteína G denominados EP₁ (*E-prostanoid 1*), EP₂, EP₃ e EP₄ [(Revisado por (118)]. A ligação da PGE₂ ao receptor EP₁ induz a ativação da proteína G_q e aumento das concentrações de Ca²⁺ intracelular, enquanto a ligação da PGE₂ ao receptor EP₃ ativa a proteína G_i, reduzindo Ca²⁺ intracelular. A ligação da PGE₂ aos receptores EP₂ e EP₄ ativa a proteína G_s, aumentando as concentrações de AMPc (120). Depois de se ligar ao seu receptor específico, a PGE₂ pode exercer diversos efeitos imunomoduladores. Neste contexto, Aronoff e colaboradores mostraram que a PGE₂ inibiu a fagocitose de macrófagos alveolares de rato mediada por receptores para IgG (FcRγ). Este efeito foi resultante da sua ligação com o receptor EP₂ e aumento das concentrações celulares de AMPc (121). Além disso, a ligação da PGE₂ ao receptor EP₄ de macrófagos humanos estimulados com LPS induziu uma redução das concentrações de RNA mensageiro para a quimiocina MIP-1β (122). A adição de PGE₂ exógena em culturas de células dendríticas derivadas de medula óssea estimuladas com LPS induziu a secreção de altas concentrações de IL-10 e inibiu a secreção de IL-12p70 (123). Além dos efeitos inibidores da PGE₂ sobre macrófagos e células dendríticas, já foi descrito também que a PGE₂ é capaz de inibir a atividade citotóxica de células NK (*Natural Killer*) (124) e inibir a proliferação de linfócitos T (125).

A PGE₂ pode atuar também nos processos de ativação e diferenciação dos linfócitos T. Katamura e colaboradores demonstraram que linfócitos obtidos de cordão umbilical humano primados na presença de PGE₂ secretaram baixas concentrações de IL-2 e IFN-γ, enquanto não houve alteração na produção de IL-4 e IL-5 (126), sugerindo que este mediador lipídico pode facilitar a diferenciação de linfócitos de padrão Th2. Além disso, foi descrito recentemente que células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas em presença de PGE₂ e IL-23 diferenciaram-se em linfócitos produtores de IL-17. A adição de indometacina, um inibidor não-seletivo para COX, nas culturas, inibiu drasticamente a diferenciação destas células (127). Estes dados sugerem que a PGE₂ pode estar relacionada também com a diferenciação de linfócitos Th17.

Além de Th2 e Th17, diversos trabalhos descreveram que a PGE₂ pode promover tanto a expansão de linfócitos T reguladores induzidos, quanto estimular a proliferação e

funções efetoras de Treg naturais. Células $CD4^+CD25^-$ do sangue periférico humano incubadas por 24 horas com PGE_2 , e em seguida, estimuladas com anticorpo contra CD3 passaram a expressar o RNA mensageiro para Foxp3 e adquiriram fenótipo supressor (128). Este dado sugere que na presença de PGE_2 , os linfócitos T não estimulados podem se diferenciar em células T reguladoras induzidas após encontrarem com o antígeno. Células $CD4^+CD25^+$ humanas incubadas com PGE_2 e em seguida estimuladas com anticorpo contra CD3 regularam positivamente a expressão do RNA mensageiro para Foxp3 e tiveram sua atividade supressora potencializada (128). Células Treg de indivíduos saudáveis que apresentaram reação positiva para tuberculina proliferaram *in vitro* em resposta a ManLam (*mannose-capped lipoarabinomannan*) de *M. tuberculosis*. A adição de NS398, um inibidor de COX-2, inibiu significativamente a expansão das células Treg, um dado adicional indicando que a PGE_2 contribui para expansão destas células (129). Além disso, foi descrito também que monócitos humanos estimulados com LPS secretam PGE_2 , a qual estimula a diferenciação de células Treg induzidas, suprimindo a proliferação de células mononucleares (130). Células tumorais podem utilizar este mecanismo de diferenciação de células Treg dependente de PGE_2 para escapar da resposta imune efetora (131).

Além das PG, os LT constituem um grupo importante de mediadores lipídicos envolvidos no recrutamento, ativação de leucócitos e regulação da síntese de citocinas (111, 132-134). Os LT, assim como outros eicosanóides, são produzidos rapidamente a partir do metabolismo do AA pela via da enzima 5-lipoxigenase (5-LO) após ativação celular. Isto diferencia os LT de outros mediadores pré-formados, como histamina ou mieloperoxidase, os quais são estocados em grânulos para liberação imediata após ativação celular, e citocinas, que requerem a transcrição de genes para a sua produção (111). Na ausência de sinais inflamatórios, a 5-LO localiza-se no citoplasma ou no nucleoplasma, e mediante estímulo, ela se transloca para a membrana nuclear, na qual se liga e inicia a metabolização do AA (135-137). O AA liberado da membrana nuclear por ação da cPLA₂ é quimicamente modificado pela 5-LO, a qual é auxiliada pela proteína ativadora da 5-LO chamada FLAP (*5-LO-activating protein*). A 5-LO catalisa a inserção de oxigênio molecular na molécula do AA, levando à formação do ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), assim como sua subsequente desidratação e formação de LTA₄ (138). O LTA₄ pode ser hidrolisado pela enzima LTA₄ hidrolase para formar LTB₄ ou ser conjugado com glutatona pela enzima LTC₄ sintase para produzir LTC₄. O LTC₄ intracelular é transportado através da membrana e convertido, pela ação da gama-glutamyl transferase em LTD₄ e LTE₄ (111, 139). LTC₄, LTD₄ e LTE₄ apresentam um resíduo de cisteína em comum e efeitos similares e são chamados coletivamente de cisteinil LT (cysLT). Alternativamente, o LTA₄ pode ser metabolizado pela

enzima 15-LO, originado a lipoxina A₄ (LXA₄). É amplamente documentada a ação antiinflamatória deste mediador lipídico (112).

Ferramentas genéticas e farmacológicas são comumente utilizadas para se estudar o papel dos LT em diversos processos infecciosos e inflamatórios (140). Neste sentido, algumas drogas como o MK-886 servem para inibir a produção de LT. É descrito que esta droga bloqueia a síntese de LT através da ligação seletiva à FLAP ou interferindo com a enzima LTC₄ sintase [(Revisado por (141)]. O MK-886 também apresenta efeitos antiproliferativos e pode induzir a apoptose de células tumorais quando administrado em doses superiores às utilizadas para inibição da síntese de LT (142, 143).

Animais geneticamente modificados deficientes de enzimas importantes na síntese de LT também representam uma ferramenta importante para o estudo do papel dos LT na inflamação. Animais deficientes para a enzima 5-LO (5-LO KO) foram construídos em um *background* de camundongos 129 e são os mais utilizados no estudo de LT [(Revisado por (144)]]. Foi demonstrado que a estimulação policlonal das células do baço destes animais, os quais são deficientes para a produção de LT, induziu a secreção de elevadas concentrações de IL-10 e IL-4, e baixas concentrações de TNF- α , IL-12 e IFN- γ em relação aos animais selvagens. Resultados semelhantes foram observados também *in vivo* (145), sugerindo que os LT endógenos são reguladores importantes da produção de citocinas inflamatórias.

Os LT são produzidos principalmente por granulócitos e células mononucleares. Neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B humanos produzem principalmente LTB₄, enquanto eosinófilos e mastócitos produzem LTC₄ (111).

As ações biológicas dos LT são mediadas através da ativação de receptores de membrana acoplados à proteína G (146, 147). O LTB₄ interage especificamente com os receptores BLT₁ e BLT₂. O BLT₁ é o receptor de alta afinidade e é responsável pela atividade quimiotática, enquanto o BLT₂ é um receptor de baixa afinidade que parece mediar a liberação de enzimas lisossomais e o aumento do metabolismo oxidativo, apesar de também participar da quimiotaxia (148-150). Além destes dois receptores, o LTB₄ pode interagir também com o fator de transcrição nuclear PPAR α , induzindo respostas antiinflamatórias (151). A expressão do receptor BLT₁ é restrita a neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos e células dendríticas (152-154), enquanto o receptor BLT₂ é expresso constitutivamente na maioria dos tecidos do organismo (152). Em 2003, Tager e colaboradores mostraram que linfócitos T CD4⁺ efetores, tanto do padrão Th1 quanto Th2, também expressavam o receptor BLT₁ e migravam para tecidos periféricos por um mecanismo dependente deste receptor (154). Desta forma, o papel do LTB₄ no recrutamento

de leucócitos para os tecidos não se restringe às células mielóides, mas também aos linfócitos efetores.

Os membros da família CysLT interagem com os receptores CysLT₁ e CysLT₂. O CysLT₁ se liga a LTD₄ com alta afinidade e ao LTC₄ e LTE₄ com afinidade mais baixa, enquanto que o CysLT₂ se liga ao LTC₄ e LTD₄ com afinidade semelhante (111). Os CysLT₁ são expressos na musculatura lisa das vias aéreas e, uma vez ativados, induzem vasoconstrição. Os CysLT₂ são expressos nos vasos sanguíneos pulmonares, estando relacionados com o aumento da permeabilidade vascular (155).

Desde 1980, quando foi descrito pela primeira vez que o LTB₄ era capaz de induzir a migração de neutrófilos *in vitro*, os LT vêm ganhando importante reconhecimento pelo seu desempenho na imunidade protetora contra infecções. Como mencionado anteriormente, o LTB₄ atua no recrutamento não somente de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (156-158), mas também de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para tecidos infectados (154). A capacidade do LTB₄ de induzir a migração de leucócitos para os tecidos é garantida por sua propriedade de ativar as integrinas leucocitárias (159, 160), estimular a expressão da integrina CD11b/CD18 na superfície de neutrófilos (161) e monócitos (162) e de induzir o aumento na expressão do receptor CCR7 na superfície de células dendríticas (163). Além do LTB₄, os CysLT também atuam promovendo a migração de células dendríticas da circulação para a mucosa respiratória de indivíduos alérgicos (164) e da epiderme para os vasos linfáticos (165).

Além da atividade quimiotática, os LT possuem também a capacidade de ativar os mecanismos fagocitários e microbicidas do sistema imune. O LTB₄ é capaz de estimular em neutrófilos humanos a produção de espécies reativas do oxigênio (166); liberação de enzimas lisossomais, α -defensinas, catepsina G e lisozima (167, 168) e induzir a fagocitose de bactéria mediada pelo receptor Fc γ R ou receptor para complemento (169). Macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *in vitro* com LTB₄ foram mais eficientes em fagocitar e eliminar *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Leishmania amazonensis* intracelular (170, 171). Além de neutrófilos e macrófagos, o LTB₄ também pode ativar as funções efectoras dos linfócitos T e das células NK. O LTB₄ pode estimular a secreção de IL-2 por linfócitos T CD4 (172) e a expressão da cadeia β do receptor da IL-2 por linfócitos T CD8 (173); estimular a produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por células do baço de camundongos (174) e induzir a produção de IL-5 por células T humanas (175). O LTB₄ estimula também a expressão da cadeia β do receptor da IL-2, sensibilidade à IL-2 e atividade citotóxica de células NK (173, 176).

Embora esteja bem estabelecido o papel dos LT como ativadores dos mecanismos microbicidas e fatores quimiotáticos, pouco se sabe ainda sobre o papel destes mediadores na defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos. Dados da literatura fornecem evidências e sugerem que estes mediadores sejam importantes no controle de diversas infecções. Animais infectados pelo vírus da influenza e tratados com LTB₄ por via intravenosa apresentaram redução na carga viral pulmonar e liberação de altas concentrações de β -defensina por neutrófilos (177). O tratamento de animais infectados por *Histoplasma capsulatum* com MK-886, um inibidor da síntese de LT, reduziu o período de sobrevida e induziu aumento da carga fúngica pulmonar, além de aumentar a secreção de TNF- α , IL-1 e KC e diminuir IFN- γ , IL-12 e IL-2 (132). Alguns autores relataram que pacientes portadores do vírus HIV apresentaram aumento na suscetibilidade às infecções pulmonares devido à deficiência na síntese de LT (178, 179). Macrófagos alveolares e polimorfonucleares obtidos destes indivíduos apresentaram atividade microbicida reduzida para *Cryptococcus neoformans*, sendo a adição exógena de LTB₄ relacionada com reversão desta deficiência (178).

Experimentos utilizando camundongos 5-LO KO contribuíram na investigação precisa do papel dos LT nos diferentes processos de ativação celular envolvidos nas infecções patogênicas. Em um deles foi relatado que animais selvagens infectados por *Klebsiella pneumoniae* por via intratraqueal apresentaram 60% de mortalidade, enquanto 100% dos camundongos deficientes para 5-LO, quando infectados, sucumbiram após a infecção. Além disso, maior número destes microorganismos foi isolado do pulmão e sangue dos animais deficientes para 5-LO quando comparado com camundongos selvagens (180). O aumento da suscetibilidade de animais 5-LO KO às infecções pulmonares parece estar associado também à deficiência na fagocitose e na atividade microbicida de macrófagos alveolares. A adição exógena de LTB₄ em culturas de macrófagos alveolares obtidos de animais deficientes para 5-LO aumentou sua capacidade fagocítica (180). Estes resultados sugerem que os LT desempenham um papel importante na ativação celular e regulação da atividade microbicida de fagócitos, e conseqüentemente, na proteção do hospedeiro contra diferentes agentes infecciosos.

1.4. Mediadores lipídicos e proteção contra tuberculose

O papel de mediadores solúveis inflamatórios como as citocinas e as quimiocinas na imunidade contra a tuberculose é bem descrito. Conforme descrito anteriormente, os mediadores lipídicos também apresentam um papel importante no sistema imune, recrutando leucócitos para locais de infecção, ativando diversos mecanismos microbicidas e

diferenciação celular. Porém, pouco se sabe ainda acerca das funções destes mediadores na resposta imune protetora contra tuberculose.

Alguns trabalhos sugerem que as PG podem participar da resposta imune contra infecções provocadas por micobactérias. Edwards e colaboradores mostraram que macrófagos de animais infectados com *M. intracellulare*, quando estimulados com antígenos de micobactérias, produziram baixas concentrações de IFN- γ e altas de PGE₂. O tratamento destes animais com indometacina, inibidor da síntese de prostaglandinas, diminuiu a recuperação dos bacilos no pulmão e baço. Estes dados sugerem que a PGE₂ produzida pelos macrófagos inibe a produção de IFN- γ pelos linfócitos e assim suprime a ativação de macrófagos e suas funções microbicidas (181). Rangel-Moreno e colaboradores mostraram que camundongos infectados com *M. tuberculosis* por via intratraqueal apresentaram uma fase inicial de resistência parcial à infecção, caracterizada pela produção de citocinas de padrão Th1, TNF- α e iNOS, seguida por uma fase de infecção progressiva, caracterizada pela produção de baixas concentrações de IFN- γ , TNF- α e iNOS, e altas concentrações de IL-4. Na fase inicial da infecção, houve a produção de baixas concentrações de PGE₂, enquanto na fase tardia e progressiva da doença houve a produção de altas concentrações de PGE₂. Quando os animais foram tratados com ácido niflúmico, um inibidor da síntese de PG, durante a fase avançada da doença, houve redução na contagem do número de bacilos nos pulmões dos animais, redução da pneumonia, aumento do tamanho dos granulomas e da produção de IFN- γ , TNF- α e iNOS (182). Resultados semelhantes foram obtidos por Hernández-Pando e colaboradores, os quais demonstraram que o tratamento de animais infectados por *M. tuberculosis* com ácido niflúmico e β -glicana, um antagonista de TGF- β , durante a fase crônica da doença, aumentou a expressão de citocinas de padrão Th1 e iNOS, e diminuiu a expressão de citocinas de padrão Th2, reduzindo a inflamação pulmonar, fibrose e carga bacteriana nos pulmões (183). Estes dados sugerem que as altas concentrações de PGE₂ induzidas na fase crônica da infecção pelo bacilo, participam na patogênese da tuberculose, desfavorecendo o controle da infecção. Peres e colaboradores descreveram que o tratamento de animais infectados por *M. tuberculosis* com celecoxib (inibidor seletivo para COX-2) resultou na diminuição do recrutamento de neutrófilos para o espaço bronco-alveolar, diminuição na produção de TNF- α , IL-1 e IL-6, e aumento na produção de IFN- γ e IL-12. Estas alterações foram associadas com redução do número de bacilos recuperados dos pulmões e aumentando do tempo de sobrevivência dos animais (184). Recentemente, foi descrito em modelo de TB pleural, que neutrófilos infectados por BCG sofreram apoptose e foram fagocitados por macrófagos do sítio da infecção, os quais secretaram altas concentrações de

PGE₂ e TGF- β , além de aumentarem a formação de corpúsculos lipídicos (185). A infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos com BCG também resultou em aumento na secreção de PGE₂, do número de corpúsculos lipídicos e da expressão do fator de transcrição nuclear PPAR- γ . A inibição do PPAR- γ pelo antagonista GW9662 inibiu a secreção de PGE₂ e a formação dos corpúsculos lipídicos, aumentando a morte dos bacilos pelos macrófagos (186). Estes dados sugerem que as PG dificultam o controle da infecção por micobactérias e que o PPAR- γ pode desempenhar um papel importante na indução da formação dos corpúsculos lipídicos e na produção de PGE₂. Coletivamente, estes resultados sugerem que as PG desempenham um papel negativo na resposta imune contra a tuberculose, contribuindo para o agravamento da doença.

Os LT também têm sido relacionados com o controle de infecções micobacterianas. Alta concentração de LTB₄ foi detectada no plasma de pacientes com tuberculose com lesões avançadas (187). Além disso, animais infectados por via intratraqueal por *M. tuberculosis* e tratados com MK-886 foram mais suscetíveis à infecção em relação aos animais não-tratados apresentando menor tempo de sobrevivência, baixa produção de IFN- γ e óxido nítrico, e maior carga bacilar nos pulmões. Os animais tratados com MK-886 tiveram não só a produção pulmonar de LTB₄ inibida, mas também de LXA₄ (188). Isto sugere que os LT apresentam um papel importante no controle da tuberculose experimental. Por outro lado, animais 5-LO KO infectados via aerossol com *M. tuberculosis* foram mais resistentes à infecção, apresentando menor número de bacilos e concentrações maiores de RNA mensageiro para IFN- γ , IL-12 e iNOS nos pulmões em relação aos animais selvagens. A maior resistência à infecção observada nos animais 5-LO KO foi associada à baixa produção de LXA₄ por estes animais em relação aos animais selvagens (189). Estes dois trabalhos mostram que os mecanismos e a participação dos LT na imunidade contra tuberculose ainda não estão totalmente elucidados.

1.5. Desenvolvimento de novas vacinas contra tuberculose

Apesar dos importantes avanços que têm ocorrido em relação ao entendimento dos mecanismos que regem a relação parasita e hospedeiro na tuberculose, novos métodos de diagnósticos, vacinas e drogas que possam prevenir e tratar melhor os casos já existentes desta doença começaram a entrar em ensaios clínicos há poucos anos. Desde a descoberta da vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) em 1921, nenhuma outra vacina para tuberculose foi liberada para uso em humanos.

A vacina BCG foi desenvolvida a partir de uma cepa atenuada de *M. bovis* virulenta, que provoca a tuberculose bovina, por Albert Calmette e Camille Guérin no Instituto Pasteur

entre 1906 e 1919 (190). Esta vacina apresenta uma série de vantagens. Como imunógeno, estimula memória imunológica de longa duração, variando de 5 a 50 anos, apenas com uma dose única de administração. Além disso, a administração de doses adicionais (reforço) e a administração como vacina oral também não apresentam contra-indicações. Pode ser administrada ao nascimento, apresenta estabilidade ao calor na forma de vacina viva liofilizada e, sobretudo, é uma vacina cuja produção requer baixo custo (191). A imunização de crianças com BCG diminui a incidência da doença, mas não confere proteção em adultos, sendo sua eficácia variável, de 0 - 80% (192). A diferença na eficácia da BCG pode estar relacionada à cepa utilizada, à dose e a diferentes protocolos de preparação, bem como às diferenças populacionais (193).

Nos últimos 20 anos investiu-se muito no desenvolvimento de novas vacinas contra tuberculose. Algumas já estão sendo testadas em ensaios clínicos (194-196). Estas vacinas podem ser divididas em dois grupos: vacinas de subunidades ou vacinas atenuadas recombinantes. As vacinas de subunidades são constituídas por um ou mais antígenos que em associação com potentes adjuvantes ou com MVA (*modified yaccinia virus Ankara*) direcionam a resposta imune contra estes antígenos específicos. Por sua vez, as vacinas atenuadas recombinantes contra tuberculose são derivadas da vacina BCG (197). Os melhores exemplos a serem citados são: a vacina rBCG-Ag85, na qual o BCG recombinante expressa o Ag85 secretado por *M. tuberculosis* (198) e a vacina rBCGΔAure: Hly, na qual o BCG expressa a listeriolisina de *Listeria monocytogenes*, responsável pela perfuração da membrana do fagossoma e favorecimento da apresentação cruzada de antígenos e da imunidade mediada por células CD8 (199).

Uma nova forma de vacinação descoberta nos anos 90 baseia-se na utilização do DNA que codifica para um antígeno de interesse. O grande diferencial das vacinas de DNA em relação ao BCG e às outras vacinas de subunidades é que elas são capazes de estimular tanto a resposta humoral quanto a resposta celular (200). Constituídas basicamente por um plasmídeo recombinante que codifica para o antígeno de interesse, estas vacinas foram e continuam sendo testadas em uma série de modelos de infecção experimental em camundongos e também em primatas não humanos, além de ensaios de fase clínica I (201).

Em 1990, Wolff e colaboradores foram os primeiros a mostrar que a vacinação por via intramuscular com plasmídeo recombinante em solução, codificando para diferentes *reporter genes*, induziu a expressão de proteínas por células musculares. Este estudo forneceu a base para o conceito de que a liberação de DNA *in vivo* poderia resultar na expressão direta de proteína (202). Dois anos depois Tang e colaboradores mostraram que o disparo na pele de microprojéteis de ouro recobertos com DNA introduzia diretamente genes codificadores de

proteínas nas células epiteliais, que por sua vez, foram capazes de estimular uma resposta humoral (203). Em seguida, Ulmer e colaboradores mostraram que a vacinação de animais com DNA codificando para a nucleoproteína A viral conferiu proteção em modelo de influenza e estimulou tanto a produção de anticorpos como a ativação dos linfócitos T CD8⁺ (204). Portanto, além de induzir ambos os tipos de resposta adaptativa, as vacinas de DNA apresentam outra vantagem: mimetizam os efeitos das vacinas vivas e atenuadas por possibilitarem a ativação dos linfócitos T CD8⁺ (200).

A primeira vacina de DNA testada em ensaios clínicos de fase I em humanos foi uma vacina contra HIV (205). Posteriormente, diferentes vacinas de DNA foram testadas como profilaxia ou terapia contra câncer, influenza, malária, hepatite B e outras vacinas para HIV-1 (206-210). Todos estes ensaios mostraram que as vacinas de DNA foram bem tolerizadas, mostrando-se seguras e sem efeitos colaterais. Até o presente momento, apenas 4 vacinas de DNA para uso animal foram licenciadas. São elas: vacina contra o vírus *West Nile* em cavalos (211), contra o vírus que causa necrose hematopoiética infecciosa em salmão (212), para o tratamento de melanoma em caninos (212) e uma vacina que codifica o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) que previne a perda do feto em suínos (213).

O mecanismo de estimulação do sistema imune após administração da vacina de DNA por via intramuscular, subcutânea, intradérmica ou por eletroporação, parece funcionar da seguinte maneira: o DNA é internalizado por células musculares e por células apresentadoras de antígenos ou APC (*Antigen presenting cells*) residentes, sendo transportado para o núcleo (214). Utilizando a maquinaria da célula hospedeira, o DNA é transcrito e traduzido, gerando uma proteína intracitoplasmática que pode sofrer proteólise e formar complexos com moléculas de classe I do MHC. No entanto, também pode ocorrer apresentação cruzada, na qual uma célula transfectada secreta a proteína traduzida que é capturada por uma APC, a qual a processa e apresenta no contexto de moléculas de classe II do MHC (215).

O Núcleo de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (NPT-FMRP-USP) desenvolveu uma vacina de DNA que codifica para proteína de choque térmico de 65 kDa (Hsp65) de *Mycobacterium leprae*. Esta vacina é constituída por um plasmídeo, no qual foi clonado o gene da Hsp65 (DNA-HSP65). Quando a vacina DNA-HSP65 foi administrada por via intramuscular em camundongos que foram posteriormente desafiados com *M. tuberculosis* ou utilizada para tratar camundongos previamente infectados com os bacilos, esta apresentou efeito profilático e terapêutico, respectivamente (216-218). O efeito profilático desta vacina de DNA foi associado à produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que expressavam altas concentrações do receptor de adesão CD44, além da atividade citotóxica (216), sendo o efeito protetor semelhante ao conferido pela vacina BCG

(218). O efeito terapêutico foi caracterizado pelo restabelecimento da produção de IFN- γ , atividade de linfócitos T CD8⁺ e menor comprometimento do parênquima pulmonar (219). Recentemente, Zárate-Bládes e colaboradores mostraram que a imunoterapia com DNA-HSP65 estimulou a expressão de diversos genes relacionados com o padrão Th1, e inibiu os de Th2, além de regular a resposta inflamatória (220).

Quando a vacina DNA-HSP65 foi testada em camundongos neonatos, observou-se que as células musculares dos animais transcreveram a mensagem para Hsp65 e não houve integração do DNA no genoma celular. Além disso, a vacinação dos neonatos não induziu tolerância. No entanto, a administração de DNA-HSP65 não foi altamente imunogênica, sugerindo que a adição de moléculas como IL-12 ou GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) à construção vacinal deve ser uma estratégia potencial para polarizar a resposta para um padrão Th1 (221).

Além de se avaliar o potencial imunogênico e a eficácia protetora da vacina DNA-HSP65, é de grande importância se estudar também a segurança na sua administração. Coelho-Castelo e colaboradores mostraram em modelo murino que não houve integração da vacina DNA-HSP65 no genoma do hospedeiro após ser administrada por via intramuscular. Ao avaliar a biodistribuição, verificou-se a presença da vacina em diversos tecidos. No entanto, a mensagem para Hsp65 micobacteriana foi detectada em músculo, linfonodos drenantes, medula óssea, baço, fígado e timo (222). Outra questão importante no que diz respeito à segurança no uso da vacina DNA-HSP65 refere-se ao fato da Hsp65 micobacteriana apresentar alta homologia com a Hsp60 humana (223-225). Esta similaridade, em associação com a estimulação desencadeada pelos motivos CpG presentes no plasmídeo de DNA recombinante poderiam gerar ou acelerar o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Com essa possibilidade em mente, passou-se a investigar os possíveis efeitos da DNA-HSP65 em diferentes modelos experimentais de doenças auto-imunes. Ao contrário do que se poderia esperar, a administração da vacina DNA-HSP65 protegeu animais do desenvolvimento de diabetes, induzida ou espontânea, assim como do desenvolvimento de artrite (226, 227). Em um modelo de aterosclerose, onde os altas concentrações de colesterol poderiam modular a resposta imune, a administração da vacina DNA-HSP65 mostrou-se imunogênica, modulando a resposta para um padrão protetor contra a tuberculose. No entanto, os dados ainda não podem confirmar se a administração de DNA-HSP65 teria também um efeito protetor para a aterosclerose (228).

A terapia com vacinas de DNA é uma alternativa promissora para o tratamento da tuberculose. No entanto, alguns grupos têm pesquisado diversas maneiras para potencializar seu efeito imunogênico e eficácia protetora. A construção de uma vacina de DNA que

codifica a proteína Hsp65 de *M. tuberculosis* fusionada à IL-2 humana foi mais eficaz em proteger camundongos infectados por *M. tuberculosis* quando comparada com a vacina de DNA codificando apenas Hsp65. O mesmo efeito pôde ser observado quando esta construção foi utilizada na terapia contra tuberculose. O efeito profilático e terapêutico foi correlacionado ao aumento da imunogenicidade gerada pela proteína de fusão, associada à potencialização da resposta Th1 (229).

O NPT-FMRP-USP também tem explorado alternativas para potencializar a eficácia protetora da vacina DNA-HSP65. A vacinação por via intramuscular com microesferas de PLGA (*Poly(lactic-co-glycolic acid)*) contendo DNA-HSP65 acrescidas de TDM, um glicolípido da parede de micobactérias com efeito adjuvante, mostrou-se protetora em camundongos e cobaias infectados com *M. tuberculosis* (230). A utilização de microesferas reduziu em 10 vezes a dose de DNA administrada. Quando os autores utilizaram duas microesferas de PLGA com composição diferente, uma de liberação rápida contendo DNA-HSP65/TDM e a outra de liberação lenta contendo a proteína recombinante Hsp65/TDM, também foi observado efeito protetor (230). Além disso, o grupo mostrou que o encapsulamento do DNA-HSP65 em lipossomas catiônicos administrados por via intranasal exerceu um efeito protetor semelhante ao observado quando foram administradas três doses de DNA em solução. É importante ressaltar que a nova formulação possibilitou uma redução de 16 vezes na concentração de DNA utilizada e o uso de apenas uma dose de vacina, administrada de modo não evasivo (via intranasal) (231).

A utilização de imunização heteróloga no regime de *prime-boost* também tem se mostrado como uma boa alternativa para potencializar efeito protetor dessa vacina. Quando camundongos foram vacinados com BCG por via intranasal e 15 dias após a primeira imunização receberam uma dose de DNA-HSP65 por via intramuscular, observou-se um aumento na proteção contra o desafio com *M. tuberculosis* em relação à proteção observada após vacinação com dose única de BCG ou com três doses de DNA-HSP65. Esta proteção foi acompanhada pela preservação do parênquima pulmonar (232).

O estudo da vacina DNA-HSP65 em humanos ainda é restrito. Reunindo os dados obtidos em modelos experimentais de tuberculose aos dados da literatura de que proteínas de choque térmico têm sido utilizadas para terapia contra câncer (233, 234) e aos dados de que a transferência do gene HSP65 micobacteriano para células tumorais desencadeia atividade antitumoral (235, 236), passou-se a avaliar o efeito da vacina DNA-HSP65 no tratamento de câncer. Ensaio clínico de fase I foram realizados para estabelecer a segurança, a dose máxima tolerada e a eficácia preliminar da terapia com DNA-HSP65 em pacientes em estágios avançados de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. A imunoterapia

foi bem tolerizada, apresentando poucos efeitos adversos e nenhuma alteração compatível com reações auto-imunes (237). Ensaios clínicos com a vacina DNA-HSP65 para tuberculose humana ainda não foram iniciados. Entretanto, nosso grupo demonstrou que a estimulação de células mononucleares de indivíduos saudáveis ou de pacientes com tuberculose (virgens de tratamento) com DNA-HSP65 induziu a diferenciação de células CD4⁺ ou CD8⁺ produtoras de IL-17 (238).

Diante do que foi exposto acerca dos estudos envolvendo a vacina DNA-HSP65 contra tuberculose e as estratégias empregadas para melhorar seu potencial imunogênico, consideramos relevante dar continuidade a estudos que permitissem elucidar mecanismos relacionados com proteção, gerados após sua administração. Apesar da importância dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ e da atividade citotóxica no efeito profilático da vacina DNA-HSP65 já ser bem estabelecida pelo grupo (216), o papel de outros leucócitos e mediadores solúveis ainda não está bem elucidado. Devido à grande importância que tem sido dada nos últimos anos aos mediadores lipídicos como as PG e LT na resposta imune contra diversas infecções, nosso grupo se interessou em avaliar o papel dos LT no efeito protetor gerado pela imunização homóloga com a vacina DNA-HSP65 ou na imunização heteróloga com BCG / DNA-HSP65.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudar o papel dos leucotrienos (LT) na proteção induzida pela imunização homóloga com DNA-HSP65 e heteróloga com BCG / DNA-HSP65 contra tuberculose experimental.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar o possível papel protetor dos LT na infecção por *M. tuberculosis*, utilizando animais com capacidade distinta em controlar a replicação dos bacilos, através da detecção de LTB₄ em amostras de pulmão e através da contagem do número de bacilos nos pulmões após inibição farmacológica da síntese de LT;
- 2) Avaliar se os LT participam na proteção conferida pelas imunizações com a vacina DNA-HSP65 ou com a vacina BCG/DNA-HSP65, através da contagem do número de bacilos nos pulmões e baço de animais deficientes para a enzima 5-LO ou em animais tratados com MK-886 (inibidor farmacológico da produção de LT endógenos);
- 3) Realizar análise histológica dos pulmões para avaliação do recrutamento e caracterização de infiltrado celular;
- 4) Avaliar a migração de diferentes populações celulares para os pulmões através de citometria de fluxo ou imunoistoquímica;
- 5) Avaliar parâmetros imunológicos associados ou não com proteção: produção de citocinas IFN- γ , IL-4, IL-12, IL-17 e produção de nitrito.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos adultos fêmeas, pertencentes às linhagens BALB/c, C57BL/6, C-129 (WT; *wild type* ou selvagens) ou deficientes para a enzima 5-LO (5-LO KO) (*background* genético C-129) com idade entre 6 a 8 semanas, pesando 15-20 g. Os animais BALB/c e C57BL/6 foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e os animais C-129 e 5-LO KO foram obtidos do Biotério II do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em isoladores, dentro da câmara de isolamento P3, no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com livre acesso à água e alimento.

3.2. Obtenção da vacina DNA-HSP65 e do vetor pVAX

Os plasmídeos pVAX-HSP65 (vacina DNA-HSP65) e pVAX (vetor) foram purificados por cromatografia de troca iônica, utilizando-se o QIAGEN Giga Plasmid Purification Kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA, USA). Para a realização desse protocolo, uma colônia de bactérias *E. coli* DH5 α TM transformada com o plasmídeo recombinante DNA-HSP65 ou plasmídeo pVAX foi retirada de uma placa recém preparada com meio LB Agar (Sigma, Germany) e canamicina (Cilinson[®]) na concentração de 100 μ g/mL. Esta colônia foi transferida para 5 mL meio LB BROTH BASE (GIBCO BRL, Scotland) com canamicina (100 μ g / mL) e cultivada durante 8 horas a 37°C em incubadora sob agitação vigorosa (250 rpm) (Incubador shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A cultura inicial foi diluída 1:500 em 2,5 L de meio LB BROTH BASE, contendo canamicina (100 μ g / mL), e incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) durante 16 horas. Após incubação, o material foi centrifugado a 6000 x g por 15 minutos a 4°C e o sedimento ressuspensão em 125 mL de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase 100 μ g / mL). Em seguida, foram adicionados 125 mL de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%) e após 5 minutos foram adicionados 125 mL do tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH 5,5). O material foi filtrado e mantido no gelo por 30 minutos. O filtrado foi aplicado em resina da QIAGEN[®] previamente equilibrada com tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15 %). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600 mL de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %) e o plasmídeo foi eluído com 30 mL de tampão QF (NaCl 1,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado em 52,5 mL de isopropanol e em seguida centrifugado a 15000 x g por 45 minutos a 4°C. O sedimento resultante foi ressuspensão em 0,5 - 1,0 mL de água Milli-Q.

A quantificação dos plasmídeos DNA-HSP65 e pVAX foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando o aparelho UV-1650 PC (Shimadzu). As concentrações de endotoxina foram determinadas pelo Limulus Amoebocyte Lysate Kit QCL-1000 (Cambrex Company, Walkersville, MD). Verificamos que nossas amostras estavam na faixa de concentrações aceitáveis de LPS segundo o FDA (*Food and Drug Administration*, USA) (iguais ou menores que 0,1 unidade de endotoxina (UE) / μg DNA).

3.3. Análise do plasmídeo purificado

Após a purificação da vacina DNA-HSP65 e do vetor pVAX, amostras desses plasmídeos foram digeridas com a enzima de restrição *Bam* HI (GIBCO, Grand Island, NY) da seguinte forma: 1 μL do plasmídeo, na concentração de 1 μg / μL , foi adicionado a 0,5 μL de *Bam* HI, 2 μL do tampão React-3 (GIBCO) e o volume final foi acertado para 20 μL com água Milli-Q. A amostra foi incubada por 1 noite a 37°C, e em seguida, aplicada em gel de agarose 1%. Verificamos que ambos os plasmídeos estavam íntegros, sendo na construção DNA-HSP65 detectada a presença de 3000 pares de base a mais, correspondente ao gene que codifica a proteína Hsp65 de *M. leprae*.

3.4. Bactérias

A linhagem virulenta Rv (H37Rv – ATCC – 29.294) de *M. tuberculosis* utilizadas para infecções experimentais foi mantida em meio de cultura líquido Midlebrook 7H9 enriquecido com OADC (BD Biosciences, SPARKS, USA) a 37°C, durante 10 dias, período em que a cultura atinge a fase logarítmica de crescimento. A partir deste período, a bactéria foi semeada em meio sólido Lowenstein-Jensen (DIFCO Laboratories, Detroit, MI – USA), onde permaneceu em cultura por 28 dias, sendo, posteriormente, mantida a -70°C. A cultura de *M. tuberculosis* passou por repiques constantes com a finalidade de manter a viabilidade da mesma. Todos os trabalhos com o bacilo da tuberculose foram realizados em cabines de segurança biológica nível III. Todo o material utilizado nesses experimentos foi descontaminado por autoclavação, antes de ser descartado.

A cepa de *M. bovis* (BCG Moreau) utilizada para as imunizações foi obtida a partir da vacina contra tuberculose comercializada para uso em humanos (Fundação Ataulpho Paiva – FAP, Rio de Janeiro, RJ).

3.5. Imunizações

Os animais imunizados com DNA-HSP65 receberam 3 doses com intervalo de 15 dias, por via intramuscular. A imunização foi feita com auxílio de uma seringa de 1 mL (BD Ultra-fine® – Becton, Dickinson – Franklin Lakes, NJ, USA), sendo administrados 100 µL de solução salina 50% sacarose v/v contendo um total de 100 µg de DNA-HSP65 por dose.

Os animais imunizados pela estratégia *prime-boost* receberam uma dose de BCG por via subcutânea contendo 1×10^5 bacilos em 100 µL de salina. Quinze dias após, os animais receberam um reforço (*boost*) com DNA-HSP65 por via intramuscular, na mesma condição descrita no parágrafo anterior.

3.6. Preparação do inóculo de *M. tuberculosis* para infecção experimental

A preparação do inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv para a infecção experimental foi feita a partir de uma alíquota congelada a -70°C . Duzentos e cinquenta microlitros dessa alíquota foram distribuídos em 2,5 mL de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC, incubando-se por 7 dias a 37°C . A suspensão de micobactérias foi centrifugada e a massa obtida foi ressuspensa em 2 mL de PBS estéril e agitada vigorosamente por 2 a 3 minutos em tubo com pérolas de vidro, até adquirir aspecto homogêneo. A viabilidade do inóculo foi testada com diacetato de fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO, USA) e brometo de etídeo, como descrito por McDonough & Kress (239). As suspensões com viabilidade superior a 85% tiveram suas concentrações acertadas de acordo com a escala nº 1 de McFarland (1×10^7 bacilos / mL) para sua utilização nas infecções experimentais.

3.7. Infecção pulmonar com *M. tuberculosis* pela via intratraqueal (i.t.)

A infecção i.t. foi realizada trinta dias após a injeção da última dose de vacina de acordo como descrito por Rosada e colaboradores (231). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com 2,2,2-Tribromoetanol 99% (ACROS, New Jersey, USA), na concentração de 2,5% em salina, na dose de 250 mg / kg de animal. Para a inoculação dos bacilos de *M. tuberculosis*, os animais anestesiados tiveram suas traquéias expostas, sendo inoculados por via i.t. com 100 µL de uma suspensão de 10^6 bacilos / mL de *M. tuberculosis* (10^5 bacilos / animal). Animais controle (branco) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e receberam 100 µL de PBS estéril.

3.8. Tratamento com MK-886 - inibidor da síntese de leucotrienos

O composto MK-886 ou L-663,536 (3 [1-(4-clorobenil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-yl]-2,2-ácidodimetilpropanóico), doado pela Merck Frosst, Canada Inc, foi diluído segundo instruções do fabricante, em 100 µL de etanol absoluto (J.T. Baker, México) e acrescido de água de modo a se obter a solução de tratamento na concentração de 0,2 mg / mL. Os animais foram tratados diariamente (durante 30 ou 70 dias) com 5 mg de MK-886 por kg de peso do animal, diluído em 0,5 mL de água por via oral (gavagem), sendo a primeira e a última dose administradas 1 hora antes da infecção com *M. tuberculosis* e 1 hora antes da eutanásia dos animais, respectivamente. Como controle experimental do tratamento, animais infetados com *M. tuberculosis* foram tratados diariamente com o mesmo volume de etanol e água.

3.9. Tratamento com celecoxib - inibidor da síntese de prostaglandinas

O medicamento comercial Celebra (Laboratórios Pfizer LTDA, Guarulhos, SP, Brasil), cujo composto ativo é o celecoxib, foi diluído em água estéril de modo a se obter a solução de tratamento na concentração de 0,2 mg / mL. Os animais foram tratados diariamente durante o protocolo de imunização por *prime-boost* com 5 mg de celecoxib por kg de peso do animal, diluído em 0,5 mL de água por via oral (gavagem), sendo a primeira e a última dose administradas 1 hora antes da injeção de BCG (*prime*) e 1 hora antes da infecção dos animais com *M. tuberculosis*, respectivamente. Como controle experimental do tratamento, animais foram tratados diariamente com o mesmo volume de água.

3.10. Coleta, digestão, processamento e obtenção de células do pulmão

A obtenção das células do pulmão foi realizada como descrito anteriormente (219). Os lóbulos inferior e médio direito, destinados aos ensaios de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e citometria de fluxo, foram pesados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo cônico (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) de 50 mL contendo 13 mL da solução de digestão. Essa solução foi preparada em meio de cultura RPMI-1640 contendo 0.5 µg / mL de Liberase (Liberase Blendzyme – Roche, Indianapolis, IN, USA) e 25 U / mL de Desoxiribonuclease I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 30 minutos. Após a digestão, as células foram dispersas com auxílio de uma seringa de 10 mL e centrifugadas por 10 minutos a 453 x g a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de RPMI-1640 complementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para inibir atividade da enzima liberase. Uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi retirada para o ensaio de unidades formadoras de colônia (UFC). O volume da suspensão foi completado

para 5 mL com RPMI-1640 complementado com 10% de SBF e as células presentes foram separadas do restante da matriz digerida utilizando-se um retalho de organza autoclavada como filtro. Após a passagem da suspensão, realizou-se a lavagem do filtro com mais 5 mL de meio RPMI-1640. As células obtidas foram centrifugadas a 453 x g, por 10 minutos, a 4°C, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI-1640 e contadas em Câmara de Neubauer. A concentração final foi ajustada para 1×10^7 células / mL. Essas células foram utilizadas para avaliação de marcadores de superfície por citometria de fluxo.

3.11. Coleta e obtenção de células do baço

Os baços foram coletados e colocados em placas de Petri de 22 mm de diâmetro (Corning, NY, USA) estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Com o auxílio de pinças estéreis, o órgão foi divulsionado para obtenção de uma suspensão celular homogênea. Uma alíquota de 100 µL foi retirada para realização do ensaio de UFC nesse órgão.

3.12. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A alíquota retirada após a digestão dos fragmentos de pulmão ou após o processamento do baço passou por diluições seriadas (10, 100, 1000, 10000 e 100000 vezes) em PBS estéril. Um volume de 100 µL das diluições foram distribuídos em meio sólido 7H11, constituído pelo meio 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido de ágar bacteriológico (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e 10% de SBF. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C por 28 dias. Decorrido o período de incubação, as colônias de bactérias foram contadas com auxílio de lupa ZOOM 2000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) para avaliação do crescimento pulmonar dos bacilos. O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e expresso em $\log_{10}$ do número de UFC por órgão ou por grama de pulmão.

3.13. Citometria de Fluxo

Todos os anticorpos utilizados na citometria foram adquiridos da BD Bioscience (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. As populações de células do pulmão foram caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície utilizando anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos. As células foram distribuídas em tubos para citometria em um volume de 100 µL por tubo ($1 \times$

10⁶ células) e incubadas durante 30 minutos, a 4°C, com anticorpo contra CD16 / CD32 de camundongo (Fc BlockTM- BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), na concentração de 0,5 µg / 10⁶ células. Posteriormente, essas células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse (0,5 – 0,75 µg de anticorpo / 1 x 10⁶ células) contra CD4 (clone RM4-5); contra CD8 (clone 53-6.7); contra CD11b (clone 553311) e contra CD11c (clone 553801), durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após o período de incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS contendo 2% de SBF, centrifugadas a 453 x g, 4°C, por 10 minutos e ressuspensas em 300 µL de PBS contendo 1% de formol (Synth, Diadema, SP, Brasil) para a fixação das células.

As preparações celulares foram adquiridas em *FACSort*TM (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram adquiridos 30.000 eventos por tubo. As células foram selecionadas pelo programa Cell Quest de acordo com parâmetros de tamanho (FSC – *Foward Scatter*), granularidade (SSC – *Side Scatter*) e marcação com os anticorpos ligados aos compostos fluorescentes ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *peridinin chlorophyll protein* (PerCP). A determinação das porcentagens de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), macrófagos (CD11b⁺) e células dendríticas (CD11c⁺) foi feita com o uso de *gate* e anticorpos específicos para cada população celular. Para a determinação do número absoluto destas populações celulares presentes nos pulmões, as células totais obtidas após a digestão enzimática do parênquima foram contadas em Câmara de Neubauer. O número de células obtido foi considerado como sendo 100%. O cálculo do número absoluto de cada população celular foi feito baseado na porcentagem de células obtidas a partir das análises da citometria utilizando a seguinte fórmula:

$$\# \text{ absoluto} = \frac{\text{número de células totais} \times \text{porcentagem (citometria)}}{100}$$

3.14. Preparação dos homogeneizados de pulmão para dosagem de citocinas e mediadores lipídicos

Para a dosagem de citocinas e mediadores lipídicos *ex vivo*, o lóbulo esquerdo do pulmão foi retirado e armazenado em tubos plásticos contendo 2 mL de RPMI-1640 a -70° C até o momento da dosagem. Após o descongelamento dos pulmões, os mesmos foram processados utilizando homogeneizador de tecidos (Ultraturax T 50 IKA – Labortechnik, Germany). Após a homogeneização, o lisado celular total obtido foi centrifugado a 4°C, 15

minutos, 453 x g. A seguir, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de citocinas e mediadores lipídicos.

3.15. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas

Para detecção da produção de citocinas por ELISA, placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com 100 µL da solução de anticorpo monoclonal purificado (IFN- γ : clone R4-6A2; IL-12: clone 9A5) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), diluído em tampão de ligação (Na_2HPO_4 0,1 M, pH 9,0) numa concentração final de 1 µg / mL. As placas foram incubadas a 4°C durante uma noite, lavadas posteriormente com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e bloqueadas pela adição de 200 µL / poço de uma solução de PBS suplementado com 10% de SBF (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (PBS / SBF 10%). Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas.

As amostras foram adicionadas, 100 µL / poço, juntamente com a curva padrão de citocina recombinante, diluída na base 2 em PBS / SBF 10% Tween 20 0,05%, e incubadas por uma noite, a 4°C. Após lavagem, foi feita incubação por 1 hora à temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal conjugado com biotina (IFN- γ : clone XGM1.2; IL-12: clone C17.8), adicionando-se 100 µL / poço do anticorpo diluído em PBS / SBF 10%/Tween 20 0,05% numa concentração final de 0,5 µg / mL. Decorrido o período de incubação, procedeu-se mais uma etapa de lavagem e foram adicionadas 100 µL / poço de solução de avidina / biotina / peroxidase, diluída 1000 vezes (*StrepAB* kitTM - Dako, Glostrup, Dinamarca), seguindo-se incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi revelada pela adição do substrato OPD (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) após procedimento de lavagem. A reação foi finalizada pela adição de 50 µL / poço de ácido sulfúrico 16% (Merck, Darmstadt, Alemanha). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (BioTek µQuant Microplate Spectrophotometer, Fischer HealthCare, Suwanee, GA, USA) em 490 nm. A determinação das concentrações das citocinas foi feita por interpolação dos resultados de absorbância obtidos nas amostras em relação aos da curva padrão. Todos os anticorpos e citocinas recombinantes foram adquiridos da BD Bioscience (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Os limites de detecção das citocinas foram: para IFN- γ : 39 pg / mL; IL-12: 9,7 pg / mL.

A detecção da produção de IL-17 por ELISA foi realizada com o *DuoSet ELISA Development System anti-mouse IL-17* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), segundo instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (BioTek μ Quant Microplate Spectrophotometer, Fischer HealthCare, Suwanee, GA, USA) em 450 nm.

3.16. Purificação e dosagem de LTB₄ e PGE₂

A dosagem de mediadores lipídicos das amostras dos homogeneizados de pulmões ou sobrenadantes de cultura foi feita de acordo com o método de Pradelles e colaboradores (240), com o auxílio direto do Dr. Carlos Arterio Sorgi. Para isto, a fração lipídica das amostras dos homogeneizados foi purificada da seguinte forma: as amostras foram acidificadas com HCl 1N pH 3,4 - 3,6 e vagarosamente passadas através de colunas Sep Pak C18 (Water associates, Milford, Mass.), lavadas previamente com 20 mL de etanol 35% e 20 mL de água. A fração lipídica contida nas amostras foi eluída da coluna com 2 mL de etanol absoluto. As amostras eluídas foram coletadas em recipientes apropriados e liofilizados em banho de nitrogênio até a secagem completa. Após a liofilização, as amostras foram ressuspensas em 250 μ L de solução tamponada (tampão EIA fornecido pelo kit de dosagem) e submetidas ao ensaio de competição imunoenzimático ACETM EIA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica das amostras foi determinada em filtro de 412 nm e a concentração dos mediadores foi calculada a partir da curva padrão fornecida pelo kit.

3.17. Detecção de nitrito

A produção de NO foi determinada pelo acúmulo de nitrito nos sobrenadantes (um produto de quebra estável do NO) do homogenato pulmonar pela reação de Griess. Cem microlitros de cada amostra foram transferidos para placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, Rochester, NY, USA) e incubadas com 100 μ L de reagente de Griess (50 μ L de sulfanilamida 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mais 50 μ L de N-1-naftiletilenodiamina 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em 5% de solução de ácido fosfórico) à temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A determinação das concentrações de nitrito (μ M) foi feita por interpolação dos resultados de absorbância obtidos nas amostras em relação aos da curva padrão, constituída por uma solução de NaNO₂ 200 μ M, diluída na base 2.

3.18. Histopatologia

Para análise histológica do pulmão dos animais, o lóbulo superior direito de cada pulmão foi coletado e fixado em formol tamponado com fosfato (pH 7,0). Posteriormente, esse material foi processado pela técnica Elaine Medeiros Floriano, no laboratório coordenado pela Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos, no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.) e analisados pela Dra. Simone Gusmão Ramos.

3.19. Imunoistoquímica

Para realização dos ensaios de imunoistoquímica, o lóbulo esquerdo do pulmão foi coletado e colocado em um suporte plástico contendo Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA). O material foi imediatamente congelado e mantido a -70°C. Os cortes dos blocos contendo o órgão foram realizados no aparelho de criostato Leica CM 1850 UV (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Os cortes foram feitos com espessura de 5 µm e foram aplicados em lâminas previamente tratadas com poli-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Em seguida, os cortes foram fixados em acetona (Synth, Diadema, SP, Brasil) gelada por 2 minutos, mantidos a -20°C durante uma noite e armazenados a -70°C até o momento da realização da técnica. Para início da marcação das lâminas, os cortes foram retirados do freezer e mantidos à temperatura ambiente por 20 minutos, seguido por fixação em acetona (Synth, Diadema, SP, Brasil) gelada por 10 minutos. Imediatamente após a fixação, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS contendo 0,01% de Tween 20 (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e 1% de albumina bovina (Inlab, São Paulo, SP, Brasil). Após a lavagem, os cortes foram incubados com uma solução de PBS contendo 3% de água oxigenada (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após esse período, os cortes foram lavados por 3 vezes e incubados por 15 minutos com o reagente A do *Avidin / Biotin Blocking Kit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA); após lavagem (3 vezes), o mesmo procedimento foi realizado com o reagente B do *kit* mencionado. Após uma nova lavagem (3 vezes), os cortes foram incubados com uma solução de leite em pó desnatado (molico) (3%) ressuspensão em água destilada por 1 hora à temperatura ambiente. Após o período de incubação, o leite foi aspirado e foram adicionados 50 µL de uma solução de PBS contendo 0,01% de Triton 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 0,25 µg do anticorpo biotilado contra Foxp3 (clone FJK-16s;

Ebioscience, San Diego, CA, USA) ou do anticorpo biotinilado controle (clone G28-5; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). Os cortes ficaram incubados em câmara úmida por 2 horas a 37°C com os anticorpos mencionados.

Para marcação do receptor CD4 (clone RM4-5), CD8 (clone 53-6.7), IFN- γ (clone R4-6A2) e IL-4 (clone 11B11) (BD Bioscience), foram adicionados após a aspiração do leite, 2,5 ng, 7,8 ng, 15,6 ng e 0,5 μ g de cada anticorpo, respectivamente, em 50 μ L da solução de PBS utilizada para a lavagem dos cortes. Os cortes foram incubados durante uma noite a 4°C em câmara úmida. Para as marcações contra CD4, CD8 e IFN- γ , os cortes foram lavados e incubados com 125 ng de anticorpo biotinilado (clone G28-5; BD Bioscience). Para as marcações contra CD11b e IL-4, os cortes foram lavados e incubados com 62,5 ng e 250 ng, respectivamente, de anticorpo biotinilado (clone G28-5; BD Bioscience) diluído em 50 μ L da solução utilizada para lavagem dos cortes. Os cortes foram então incubados por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a incubação com o anticorpo biotinilado, os cortes foram incubados com 50 μ L de uma solução contendo avidina / biotina / peroxidase (*Vectastain Elite ABC Kit*; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), diluído segundo instruções do fabricante, por 30 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram revelados pela adição de substrato *DAB* (3,3' diaminobenzidine) *Substrate Kit for peroxidase* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) após procedimento de lavagem.

Após esse procedimento, os cortes foram contra-corados com hematoxilina, analisados no microscópio Leitz Aristoplan (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) e fotografados com auxílio da câmara Leica DFC 280 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Foram fotografados 20 campos de cada corte (aumento de 40x para Foxp3, CD4 e CD8, e 20x para IFN- γ e IL-4) e, com auxílio do programa ImageJ, foi contabilizado o número absoluto de células positivas ou a área de marcação total em cada lâmina (20 campos).

3.20. Purificação de células CD4⁺CD25⁺

No ensaio de transferência celular, suspensões de células do baço de animais selvagens ou deficientes para 5-LO foram preparadas conforme descrito anteriormente e as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ foram isoladas com o *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), segundo instruções do fabricante. As células T reguladoras obtidas foram caracterizadas pela expressão de Foxp3, cuja expressão é intracelular, e das moléculas de superfície CD4 e CD25 através da seguinte

metodologia: as células T reguladoras do baço foram distribuídas em tubos para citometria e o procedimento descrito no subitem “*Citometria de fluxo*” foi realizado para marcação da molécula CD4 (clone RM4-5). A marcação de CD25 é realizada durante o processo de isolamento das células Treg. No final desse procedimento, as células não foram ressuspensas em PBS contendo formol, mas seguiram o protocolo de permeabilização e marcação para Foxp3 (clone FJK-16s) utilizando o *Kit FITC-Anti-Rat / Mouse Foxp3 Staining Set* (Ebioscience, San Diego, CA, USA), segundo instruções do fabricante. As preparações celulares foram analisadas em *FACSort*TM (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram adquiridos 30.000 eventos por tubo. As células foram selecionadas pelo programa *Cell Quest* de acordo com parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com FITC, PE e PercP. As análises da expressão de Foxp3 por células CD4⁺CD25⁺ foram realizadas na população de linfócitos por histograma.

3.21. Transferência de células Treg

Para o ensaio de transferência de células CD4⁺CD25⁺, animais WT ou 5-LO KO foram imunizados pelo esquema de *prime-boost* e trinta dias depois da última imunização os baços foram coletados e as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ foram isoladas conforme descrito anteriormente. A seguir, foi feito um *pool* com as células T reguladoras obtidas de animais WT ou 5-LO KO e a concentração foi acertada para 6×10^6 células / mL. Um volume de 100 µL desta suspensão celular contendo 6×10^5 células T reguladoras foi injetado por via i.v. (plexo retro-orbital) em animais WT não imunizados e não infectados. Vinte e quatro horas após a transferência, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* (1×10^5 bacilos / animal) e 30 dias depois, o número de UFC foi determinado nos pulmões e baços.

3.22. Análise estatística

Para a análise estatística, utilizamos o teste *t* não-pareado e não-paramétrico (teste de Mann-Whitney). Os dados foram analisados no programa estatístico PRISM (versão 5.0, GraphPad, San Diego, CA, USA). Foram considerados significativos os dados com $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1) Papel dos Leucotrienos (LT) na suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis*

Produção de LTB₄ no pulmão de animais BALB/c e C57BL/6 infectados

Em estudo realizado previamente pelo nosso laboratório, Oliveira e Paula e colaboradores mostraram que camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 apresentavam capacidade distinta em controlar a infecção por *M. tuberculosis*, sendo os animais BALB/c mais suscetíveis comparados aos animais C57BL/6 (102). Com o objetivo de avaliar o envolvimento dos LT na suscetibilidade à infecção, a produção de LTB₄ foi avaliada nos pulmões de animais de ambas as linhagens aos 30 e 70 dias após a infecção.

Na Figura 1 observa-se que 30 dias após a infecção, animais BALB/c apresentaram redução nas concentrações de LTB₄ pulmonar comparadas às concentrações detectadas nos pulmões de animais não infectados (grupo PBS) ($p > 0.05$). Aos 70 dias, foi possível observar redução mais acentuada, estatisticamente significativa na produção de LTB₄ nos pulmões destes animais. Em animais C57BL/6 verificou-se aumento significativo na produção de LTB₄ detectada nos pulmões 30 dias após infecção em relação aos animais não infectados. Aos 70 dias, as concentrações de LTB₄ permaneceram elevadas, porém, não sendo mais estatisticamente diferentes daquelas detectadas em pulmões de animais não infectados (grupo PBS). Observou-se ainda que as concentrações basais de LTB₄ detectadas nos pulmões de animais BALB/c (grupo PBS) foram significativamente maiores que aquelas detectadas em animais C57BL/6. Entretanto, aos 30 e 70 dias de infecção, animais C57BL/6 secretaram concentrações significativamente maiores de LTB₄ nos pulmões comparadas às aquelas detectadas nos respectivos períodos em animais BALB/c.

Figura 1: Concentrações de LTB₄ nos pulmões de animais BALB/c e C57BL/6 infectados por *M. tuberculosis*. Os animais foram infectados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Trinta ou setenta dias após a infecção, a concentração de LTB₄ foi detectada nos homogeneizados de pulmão por ELISA. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 3-5 animais por grupo. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ em relação ao grupo C57BL/6-PBS (não infectado); @ $p < 0,05$ em relação ao grupo BALB/c- Mtb - 30 dias; ∞ $p < 0,05$ em relação ao grupo BALB/c- Mtb - 70 dias.

Crescimento de *M. tuberculosis* nos pulmões e baços de animais BALB/c e C57BL/6 tratados com MK-886

Em 2007, Peres e colaboradores mostraram ao inibir a síntese de LT com a administração do composto MK-886 em camundongos BALB/c, que estes mediadores desempenhavam papel protetor na infecção por *M. tuberculosis* (188). Com a finalidade de estudar se a inibição na síntese de LT tornava os animais C57BL/6 mais suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis*, grupos de animais BALB/c e C57BL/6 foram tratados com MK-886 uma hora antes e durante a infecção e o número de bacilos foi avaliado nos pulmões e nos baços. Como controle, alguns grupos foram tratados apenas com água.

Como já havia sido descrito previamente por nosso grupo, trinta dias após a infecção, o número de bacilos (UFC) nos pulmões dos animais C57BL/6 foi maior que aquele detectado nos animais BALB/c avaliado no mesmo período ($p < 0.05$) (Figura 2A). O tratamento dos animais BALB/c infectados com MK-886 durante trinta dias resultou em aumento significativo do número de UFC nos pulmões em relação aos animais infectados não tratados (Figura 2A). Animais C57BL/6 tratados com MK-886 apresentaram número de bacilos nos pulmões semelhante àquele detectado em animais que não foram tratados aos trinta dias de infecção.

Setenta dias após a infecção, foi possível observar que o número de UFC nos pulmões de animais BALB/c foi significativamente maior comparado àquele de animais C57BL/6 (Figura 2B). O tratamento com MK-886 não alterou o crescimento do bacilo nos pulmões dos animais BALB/c, mas tornou animais C57BL/6 infectados mais suscetíveis à infecção, uma vez que o número de bacilos nos pulmões dos animais tratados foi significativamente maior comparado com animais C57BL/6 não tratados.

O número de UFC detectado em baços de animais BALB/c e C57BL/6 não foi estatisticamente diferente aos trinta dias de infecção (Figura 2C). O tratamento com MK-886 durante trinta dias de infecção também não afetou de modo significativo o número de bacilos nos baços de animais BALB/c e C57BL/6. Setenta dias após a infecção, o número de bacilos no baço de animais BALB/c foi significativamente maior comparado àquele de animais C57BL/6 (Figura 2D). O tratamento com MK-886 não alterou o número de UFC no baço de ambas as linhagens quando comparado ao de animais que não foram tratados.

Figura 2: Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos pulmões e baços de animais BALB/c e C57BL/6 infectados por *M. tuberculosis*. Os animais foram infectados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Uma hora antes e durante trinta ou setenta dias após a infecção, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) ou água por via oral. Após esse período, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi avaliado nos pulmões (A – 30 dias; B – 70 dias) e nos baços (C – 30 dias; D – 70 dias) dos animais. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de 5-6 animais avaliados aos 30 dias de infecção e 16-23 animais avaliados aos 70 dias de infecção. * $p < 0,05$.

Número absoluto de células CD4⁺ e CD8⁺ nos pulmões de animais BALB/c e C57BL/6 infectados e tratados com MK-886

Os resultados apresentados a seguir mostram o influxo de células CD4⁺ e CD8⁺ para os pulmões, uma vez que os LT são mediadores que atuam no recrutamento celular durante as respostas inflamatórias.

Observou-se maior número de células CD4⁺ nos pulmões de animais BALB/c aos trinta dias após a infecção com *M. tuberculosis* em relação ao número dessas células encontradas nos pulmões dos animais não infectados (Figura 3A). Animais BALB/c infectados com *M. tuberculosis* recrutaram para os pulmões cinco vezes e sete vezes mais células CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, quando estes números foram comparados aos grupos não infectados (Figuras 3A e 3C). O tratamento com MK-886 de animais infectados, embora tenha tornado esses animais mais suscetíveis à infecção avaliada aos trinta dias (Figura 2A), não afetou o recrutamento de células CD4⁺ para os pulmões (Figura 3A). Resultados similares foram obtidos com relação ao influxo de células CD8⁺ (Figura 3C). Não foi possível fazer análise estatística em decorrência do pequeno número de animais avaliados quanto a este parâmetro. Nos grupos de animais C57BL/6 infectados, foi possível observar aumento significativo do número de células CD4⁺ e CD8⁺ nos pulmões após trinta dias de infecção quando comparados ao de animais não infectados (Figuras 3A e 3C). Animais da linhagem C57BL/6 infectados recrutaram para os pulmões oito vezes e vinte e duas vezes mais células CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, comparados aos animais não infectados. O tratamento com MK-886 também não afetou o recrutamento de linfócitos para os pulmões desta linhagem após a infecção por *M. tuberculosis* (Figuras 3A e 3C).

Setenta dias após a infecção com *M. tuberculosis*, o recrutamento de células CD4⁺ e CD8⁺ para os pulmões de animais BALB/c foi cinco vezes e três vezes maior, respectivamente, em relação ao número destas células detectado nos pulmões de animais não infectados (Figuras 3B e 3D). O tratamento com MK-886 de BALB/c infectados reduziu em aproximadamente 50% o número de células CD4⁺ e CD8⁺ recrutadas para os pulmões ($p>0,05$). Animais C57BL/6 infectados por setenta dias com *M. tuberculosis* recrutaram números significativamente maiores de células CD4⁺ e CD8⁺ para os pulmões, em relação aos animais não infectados (Figuras 3B e 3D). O tratamento com MK-886 não afetou o recrutamento de células CD4⁺ e CD8⁺ para os pulmões de C57BL/6 infectados. Diferente dos resultados de trinta dias de infecção, aos setenta dias, animais BALB/c infectados recrutaram número significativamente maior de células CD4⁺ e CD8⁺ para os pulmões, em relação aos

animais da linhagem C57BL/6 infectados. Resultado semelhante foi observado nos grupos de ambas as linhagens infectadas e tratadas com MK-886.

Figura 3: Número absoluto de células CD4⁺ e células CD8⁺ nos pulmões de animais BALB/c ou C57BL/6 infectados por *M. tuberculosis*. Os animais foram infectados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Uma hora antes e durante trinta ou setenta dias após a infecção, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) ou água por via oral. Após esse período, os pulmões foram digeridos para obtenção de suspensão de células pulmonares. O número absoluto de células CD4⁺ (A - 30 dias; B - 70 dias) e CD8⁺ (C - 30 dias; D - 70 dias) foi determinado por citometria de fluxo, conforme descrito em *Material e métodos*. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de 2-6 animais para 30 dias e 5-7 animais para 70 dias de infecção. * $p < 0,05$.

Número absoluto de células CD11b⁺ e CD11c⁺ nos pulmões de animais BALB/c e C57BL/6 infectados e tratados com MK-886

As populações de células CD11b⁺, que representam os macrófagos, e CD11c⁺, que representam as células dendríticas, também foram estudadas.

Observou-se maior número de células CD11b⁺ nos pulmões de animais BALB/c aos trinta dias após a infecção com *M. tuberculosis* em relação ao número dessas células encontradas nos pulmões dos animais não infectados (Figura 4A). O tratamento com MK-886 de animais infectados não afetou o recrutamento de células CD11b⁺ para os pulmões, quando comparado ao de animais infectados não tratados (Figura 4A). O influxo de células CD11c⁺ para os pulmões de animais BALB/c infectados por trinta dias foi cinco vezes maior em relação ao de animais não infectados (Figura 4C). O tratamento com MK-886 reduziu o recrutamento destas células para os pulmões de animais infectados. Não foi possível fazer análise estatística em decorrência do pequeno número de animais avaliados quanto a este parâmetro.

Nos grupos de animais C57BL/6 infectados, foi possível observar aumento do número de células CD11b⁺ e CD11c⁺ nos pulmões após trinta dias de infecção quando comparados ao de animais não infectados ($p>0,05$). O tratamento com MK-886 também não afetou o recrutamento de células CD11b⁺ e reduziu a migração de células CD11c⁺ para os pulmões desta linhagem após a infecção por *M. tuberculosis* ($p>0,05$) (Figuras 4A e 4C).

Aos trinta dias de infecção, animais BALB/c infectados apresentaram números semelhantes de células CD11b⁺ nos pulmões em relação aos animais C57BL/6 infectados. O mesmo resultado foi visto nos grupos infectados e tratados com MK-886. Por outro lado, aos trinta dias de infecção, os animais BALB/c apresentaram recrutamento maior de células CD11c⁺ para os pulmões comparado aos de animais C57BL/6. Os animais BALB/c infectados e tratados com MK-886 também recrutaram mais células CD11c⁺ para os pulmões, comparados aos C57BL/6 neste período.

Setenta dias após a infecção com *M. tuberculosis*, o recrutamento de células CD11b⁺ para os pulmões de animais BALB/c foi quatro vezes maior em relação ao número destas células detectado nos pulmões de animais não infectados (Figuras 4B). O tratamento com MK-886 de BALB/c infectados reduziu o número de células CD11b⁺ recrutadas para os pulmões, em relação aos animais infectados e não tratados (Figura 4B).

Animais C57BL/6 infectados por setenta dias com *M. tuberculosis* recrutaram números significativamente maiores de células CD11b⁺ para os pulmões em relação aos animais não infectados (Figuras 4B), enquanto que o recrutamento de células CD11c⁺ não foi

alterado. O tratamento com MK-886 não afetou o recrutamento de células CD11b⁺ e CD11c⁺ para os pulmões de C57BL/6 infectados.

Setenta dias após a infecção, os animais BALB/c recrutaram números significativamente maiores de células CD11b⁺ para os pulmões em relação aos C57BL/6. Grupos de BALB/c infectados e tratados com MK-886 também recrutaram mais células CD11b⁺ para os pulmões, em relação aos C57BL/6 infectados e tratados. O recrutamento de células CD11c⁺ para os pulmões de BALB/c infectados também foi maior aos setenta dias de infecção, quando comparado aos de C57BL/6 ($p>0,05$). Resultado semelhante foi observado nos grupos de BALB/c tratados com MK-886, os quais apresentaram números significativamente maiores de células CD11c⁺ nos pulmões comparados aos C57BL/6.

Figura 4: Número absoluto de células CD11b⁺ e CD11c⁺ nos pulmões de animais BALB/c ou C57BL/6 infectados por *M. tuberculosis*. Os animais foram infectados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Uma hora antes e durante trinta ou setenta dias após a infecção, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) ou água por via oral. Após esse período, os pulmões foram digeridos para obtenção de suspensão de células pulmonares. O número absoluto de células CD11b⁺ (A - 30 dias; B - 70 dias) e CD11c⁺ (C - 30 dias; D - 70 dias) foi determinado por citometria de fluxo. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de 2-6 animais para 30 dias e 5-7 animais para 70 dias de infecção. * $p < 0,05$.

4.2) Papel dos LT na proteção conferida por vacinas contra a tuberculose

Número de Unidades Formadoras de Colônia nos pulmões de animais imunizados ou não

Os resultados descritos até aqui mostram que a linhagem C57BL/6 secretou mais LTB₄, tanto na fase inicial (30 dias) quanto na fase tardia (70 dias) da infecção com *M. tuberculosis*, comparada à linhagem BALB/c. A inibição na síntese de LT aumentou a suscetibilidade dos animais BALB/c na fase inicial, mas não na fase tardia da infecção. O contrário ocorreu com os animais C57BL/6, cujo tratamento tornou essa linhagem suscetível na fase tardia da infecção. Embora mais suscetíveis, ambas as linhagens foram capazes de recrutar leucócitos para o local da infecção após o tratamento. Como estes dados, conjuntamente aos dados descritos no trabalho de Peres e colaboradores (188), sugerem um papel protetor dos LT na infecção por *M. tuberculosis*, nós passamos a avaliar se os LT desempenhavam papel importante na proteção conferida pela imunização heteróloga (*prime-boost*) BCG subcutâneo/DNA-HSP65 intramuscular ou pela imunização homóloga com DNA-HSP65 intramuscular contra TB experimental. Para testar esta hipótese, utilizamos duas ferramentas experimentais: I. animais deficientes para a enzima 5-LO (5-LO KO); II. animais tratados com MK-886.

Na primeira estratégia de estudo, animais 5-LO KO ou selvagens (WT – *wild type*) foram submetidos ao protocolo convencional de imunização homóloga com DNA-HSP65 por via intramuscular ou ao protocolo de imunização heteróloga com BCG/DNA-HSP65. Como controle da imunização com DNA-HSP65, um grupo de animais recebeu apenas plasmídeo pVAX sem o gene que codifica para Hsp65 (vetor). Trinta dias após a última imunização, os animais foram desafiados pela via intratraqueal com *M. tuberculosis* (Tabela 1). A eficácia protetora das vacinas foi avaliada 30 dias após o desafio através da contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) nos pulmões e baço dos animais.

A comparação entre o número de UFC detectado nos pulmões de animais WT e 5-LO KO não imunizados e infectados (salina) mostra que os animais 5-LO KO foram mais suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis* (Figura 5A), uma vez que estes animais apresentaram número significativamente maior de bacilos nos pulmões comparado ao grupo WT.

A imunização de animais WT tanto pela estratégia *prime-boost* quanto com DNA-HSP65 seguida do desafio (PB ou DNA, respectivamente) reduziu de modo significativo o

número de UFC nos pulmões comparado aos animais infectados que não foram imunizados (salina) (Figura 5A). Observamos que enquanto a imunização com DNA-HSP65 foi capaz de reduzir em aproximadamente $0,5 \log_{10}$ o número de UFC, a imunização heteróloga resultou na diminuição de $1,1 \log_{10}$, ou seja, redução de aproximadamente 10 vezes o número de bacilos em relação aos animais não imunizados (Figura 5B). O número de UFC detectado nos pulmões de animais que receberam pVAX e foram desafiados (vetor) foi semelhante ao de animais que não foram imunizados (salina).

Em relação aos animais 5-LO KO, apenas a imunização com a estratégia *prime-boost* (PB) foi capaz de reduzir significativamente o número de UFC nos pulmões dos animais desafiados. O número de bacilos detectado após imunização com DNA-HSP65 (DNA) ou após a administração de pVAX (vetor) foi muito semelhante comparado àquele obtido para animais que não foram imunizados (Figura 5A).

Conforme descrito, a imunização pela estratégia *prime-boost* foi capaz de reduzir significativamente o número de UFC nos pulmões de ambos os grupos (WT e 5-LO KO). Porém, enquanto a imunização heteróloga reduziu 10 vezes ($1,1 \log_{10}$) o número de bacilos no grupo WT, uma diminuição de $0,7 \log_{10}$ foi observada no grupo 5-LO KO (Figura 5B). Estes dados sugerem que a eficácia protetora da estratégia *prime-boost* foi reduzida na ausência de LT endógenos. Enquanto nos animais WT a vacinação com DNA-HSP65 reduziu em $0,5 \log_{10}$ o número de UFC, em animais 5-LO KO houve diminuição de apenas $0,1 \log_{10}$, evidenciando também redução na eficácia protetora da vacina DNA-HSP65 quando houve ausência de LT endógenos.

Considerando a segunda ferramenta experimental utilizada, animais da linhagem BALB/c foram submetidos ao protocolo convencional de imunização homóloga com DNA-HSP65 por via intramuscular ou ao protocolo de imunização heteróloga. Trinta dias depois da última imunização, os animais foram desafiados pela via intratraqueal com *M. tuberculosis* (Tabela 1). Uma hora antes e durante os 30 dias subsequentes ao desafio com os bacilos, os animais foram tratados diariamente com MK-886 por via oral com o objetivo de bloquear a síntese endógena de LT durante a efetuação da resposta imune induzida pelas vacinas (grupo Mtb + MK-886). Como controle experimental, os animais foram tratados com água (grupo Mtb + água). A eficácia protetora das vacinas foi avaliada ao final dos 30 dias após o desafio através da contagem do número de UFC nos pulmões e baço.

Assim como nos animais 5-LO KO, animais BALB/c infectados e tratados com MK-886 (salina) foram mais suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis* em relação aos animais infectados que não foram tratados, uma vez que foi observado um aumento significativo no número de UFC nos pulmões (Figura 5C).

Animais BALB/c imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) apresentaram números significativamente menores de UFC nos pulmões em relação aos animais infectados que não foram imunizados (salina) (Figura 5C). A imunização heteróloga foi capaz de reduzir em mais de 10 vezes o número de bacilos nos pulmões, enquanto, a imunização dos animais BALB/c com a vacina DNA-HSP65 praticamente não protegeu os animais desafiados (Figura 5D).

O tratamento com MK-886 de animais BALB/c imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) não interferiu no efeito profilático da vacina, uma vez que observamos uma redução significativa do número de UFC nos pulmões de animais imunizados, desafiados e tratados com o composto (Mtb + MK-886), em relação ao respectivo grupo não tratado (Mtb + água) (Figura 5C). A imunização por *prime-boost* reduziu em mais de 10 vezes o número de UFC nos pulmões de animais tratados com MK-886 (Figura 5D). Mesmo com a inibição de LT endógenos, a vacina DNA-HSP65 também foi capaz de reduzir significativamente o número de UFC nos pulmões dos animais desafiados (Figura 5C). Porém, a redução do número de bactérias induzida pela vacinação com DNA-HSP65 foi menor em relação àquela observada em animais imunizados pela estratégia *prime-boost* (Figura 5D).

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais indicados nas figuras.

Ferramenta Experimental 1	
Animais WT ou 5-LO KO	
salina	animais não imunizados e infectados
PB	animais imunizados pela estratégia <i>prime-boost</i> e desafiados
DNA	animais imunizados com DNA-HSP65 e desafiados
vetor	animais que receberam pVAX e foram desafiados

Ferramenta Experimental 2	
Animais tratados ou não com MK-886	
salina	animais não imunizados e infectados (tratados com água ou MK-886)
PB	animais imunizados pelo esquema <i>prime-boost</i> e desafiados (tratados com água ou MK-886)
DNA	animais imunizados com DNA-HSP65 e desafiados (tratados com água ou MK-886)
vetor	animais que receberam pVAX e foram desafiados (tratados com água ou MK-886)

Figura 5: Número de UFC em pulmões de animais deficientes para 5-LO ou tratados com MK-886, imunizados ou não. (A e B) Animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) e **(C e D)** animais BALB/c foram imunizados pelo esquema *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA) conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47; tabela 1). Trinta dias após a última imunização, os animais foram desafiados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Alguns grupos foram apenas infectados (salina) ou receberam o vetor pVAX e foram desafiados (vetor). Durante 30 dias após a infecção, os animais BALB/c foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) (Mtb + MK-886) ou água (Mtb + água) por via oral. Após esse período, o número de UFC foi avaliado nos pulmões de ambos os grupos. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes (Grupos de 5-10 animais nos experimentos de WT ou 5-LO KO e 7-11 animais nos experimentos de BALB/c tratados com MK-886). * $p < 0,05$. **(B e D)** Redução do número de UFC nos pulmões resultante da imunização pelo esquema *prime-boost* ou DNA-HSP65. O número de UFC foi obtido através da subtração da média do número de UFC detectado em animais imunizados menos o número de UFC detectado em animais não-imunizados.

Número de Unidades Formadoras de Colônia nos baços de animais imunizados ou não

Da mesma forma de como foi observado nos pulmões, os baços de animais 5-LO KO infectados também apresentaram número significativamente maior de UFC em relação aos de animais WT (Figura 6A; tabela 1), reforçando os dados de que a deficiência na síntese de LT resulta em maior suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis*.

Os baços de animais WT imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) apresentaram número significativamente menor de bacilos em relação aos animais infectados que não foram imunizados (salina) (Figura 6A). Grupos de animais WT que foram vacinados com DNA-HSP65 ou que receberam o vetor pVAX e foram desafiados não foram capazes de reduzir significativamente o número de bacilos neste órgão. Uma análise comparativa revela que a estratégia *prime-boost* reduziu em 0,8 log₁₀ o número de UFC no baço e a imunização com DNA-HSP65 praticamente não reduziu a carga bacilar (Figura 6B). Corroborando com os resultados obtidos para os pulmões, apenas a imunização heteróloga foi capaz de reduzir significativamente o número de UFC no baço de animais 5-LO KO desafiados (PB) (Figura 6A). Esta redução foi de 0,5 log₁₀ no número de UFC comparado aos animais 5-LO KO não vacinados e infectados, enquanto a imunização homóloga com DNA-HSP65 reduziu apenas 0,1 log₁₀ o número de bacilos (Figura 6B). Em animais 5-LO KO, a eficácia da imunização pelo *prime-boost* em termos de carga bacilar no baço foi reduzida (0,5 log₁₀) em relação aos animais WT vacinados (0,8 log₁₀) (Figura 6B).

A imunização de animais BALB/c pela estratégia *prime-boost* (PB) ou com DNA-HSP65 (DNA) seguida do desafio, reduziu em aproximadamente 10 vezes o número de UFC no baço, enquanto o número de bacilos detectado em animais que receberam pVAX foi semelhante àquele obtido em animais que foram apenas infectados (salina) (Figura 6C). Nos grupos infectados tratados com MK-886, a imunização heteróloga e a homóloga reduziram 0,8 e 0,4 log₁₀, respectivamente, o número de UFC no baço, indicando que na deficiência da síntese de LT endógenos, as vacinas testadas perderam parcialmente seu potencial protetor.

Figura 6: Número de UFC no baço de animais deficientes para 5-LO ou tratados com MK-886, imunizados ou não. (A e B) Animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) e (C e D) animais BALB/c foram imunizados pelo esquema *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA) conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47; tabela 1). Trinta dias após a última imunização, os animais foram desafiados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Alguns grupos foram apenas infectados (salina) ou receberam o vetor pVAX e foram desafiados (vetor). Durante 30 dias após a infecção, os animais BALB/c foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) (Mtb + MK-886) ou água (Mtb + água) por via oral. Após esse período, o número de UFC foi avaliado no baço de ambos os grupos. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes (Grupos de 5-10 animais nos experimentos de WT ou 5-LO KO e 7-11 animais nos experimentos de BALB/c tratados com MK-886). * $p < 0,05$. (B e D) Redução do número de UFC no baço resultante da imunização pelo esquema *prime-boost* ou DNA-HSP65. O número de UFC foi obtido através da subtração da média do número de UFC detectado em animais imunizados menos o número de UFC detectado em animais não-imunizados.

Produção de mediadores lipídicos no pulmão de animais imunizados ou não

Observamos que a produção de LTB₄ por animais WT imunizados pela estratégia *prime-boost* (PB), DNA-HSP65 (DNA) ou injetados com pVAX (vetor) e, posteriormente desafiados com *M. tuberculosis*, foi semelhante à observada em animais não imunizados e infectados (salina) (Figura 7A, tabela 1). Embora os animais 5-LO KO sejam deficientes para a enzima 5-LO (responsável pela produção de LT), foi possível detectar a produção de LTB₄ em sobrenadantes dos homogeneizados dos pulmões de animais imunizados ou não com as diferentes estratégias empregadas e desafiados (Figura 7A). Estas concentrações foram menores que aquelas detectadas em animais WT infectados.

Quanto à produção de PGE₂, animais WT imunizados ou não, e infectados, produziram concentrações semelhantes deste mediador (Figura 7B).

Animais 5-LO KO imunizados ou não, e posteriormente infectados, produziram concentrações de PGE₂ seguramente maiores que aquelas detectadas nos respectivos grupos de animais WT (Figura 7B). Porém, ainda não é possível avaliar a magnitude desta diferença, uma vez que os resultados das dosagens de PGE₂ por animais 5-LO KO foram maiores que o limite máximo de detecção da curva (o que não aconteceu com as amostras de animais WT). Para avaliar a real diferença de produção de PGE₂ entre animais WT e 5-LO KO, será preciso fazer uma nova dosagem utilizando as amostras mais diluídas.

Figura 7: Concentrações de leucotrieno B₄ (LTB₄) e prostaglandina E₂ (PGE₂) nos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO), imunizados ou não. Os animais foram imunizados pelo esquema *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA) conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47; tabela 1). Trinta dias após a última imunização, foram desafiados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Alguns grupos foram apenas infectados (salina). Trinta dias após a infecção, os pulmões foram homogeneizados e as concentrações de LTB₄ (A) e PGE₂ (B) foram detectadas por ELISA nos sobrenadantes. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão de dois experimentos independentes, num total de 7-9 animais avaliados. * $p < 0,05$.

Avaliação histológica dos pulmões de animais imunizados ou não

A infecção de animais WT com *M. tuberculosis* induziu um infiltrado inflamatório difuso por toda a área do pulmão avaliada (lóbulo superior direito de cada grupo estudado) (Figura 8B), com alta frequência de macrófagos espumosos e linfócitos, e poucos neutrófilos (Figura 9B). Além disso, foi observada também hiperplasia de tecidos linfóides associados aos brônquios ou BALT (BALT; *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*). A infecção de animais 5-LO KO resultou em infiltrado inflamatório menos intenso em relação aos animais WT (Figuras 8C e 9C). Os animais WT imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (Figuras 8D e 9D) apresentaram reação inflamatória mais localizada e menos intensa em relação àqueles não imunizados e infectados (Figuras 8B e 9B), com um menor comprometimento do parênquima. Nos animais 5-LO KO que receberam a imunização heteróloga e foram desafiados (Figuras 8E e 9E) também foi possível observar um comprometimento menor do parênquima pulmonar comparado aos 5-LO KO infectados que não foram imunizados (Figuras 8C e 9C). Os animais WT imunizados com DNA-HSP65 desafiados (Figuras 8F e 9F) apresentaram um perfil histológico semelhante aos de animais WT imunizados com a estratégia *prime-boost* e desafiados (Figuras 8D e 9D), com infiltrado leucocitário menos intenso e preservação do parênquima pulmonar em relação aos animais WT infectados não imunizados (Figuras 8B e 9B). O perfil do infiltrado celular em animais 5-LO KO imunizados com DNA-HSP65 e desafiados (Figuras 8G e 9G) foi semelhante àquele observado em animais 5-LO KO não imunizados e infectados (Figuras 8C e 9C). O recrutamento de leucócitos e a hiperplasia do BALT nos pulmões dos animais 5-LO KO imunizados com DNA-HSP65 e desafiados (Figura 8G e 9G), foram menores em relação à de animais WT imunizados com DNA-HSP65 (Figuras 8F e 9F). Em animais WT que receberam pVAX e foram desafiados (Figuras 8H e 9H), foi possível observar uma inflamação difusa, semelhante àquela encontrada em animais WT não imunizados e infectados (Figuras 8B e 9B). Porém, o infiltrado celular foi menor. Nos animais deficientes para 5-LO que receberam pVAX e foram desafiados (Figuras 8I e 9I), o influxo de leucócitos foi menor e mais focal em relação aos animais WT que receberam pVAX (Figuras 8H e 9H). Foi possível observar também a presença de aglomerados de macrófagos espumosos e hiperplasia de BALT.

Na Figura 9 são apresentados os dados histopatológicos dos animais tratados com MK-886. A infecção com *M. tuberculosis* de animais não tratados induziu uma reação inflamatória difusa, com presença de infiltrados focais de leucócitos. Foi observada também a presença de aglomerados de macrófagos espumosos, pequenas quantidades de neutrófilos e regiões com hiperplasia de BALT (Figuras 10B e 11B). Quando os animais infectados foram tratados com MK-886, houve uma visível redução do infiltrado inflamatório nos pulmões

(Figuras 10C e 11C). Mesmo assim, foi possível observar a presença de infiltrados focais de leucócitos, semelhantes àqueles encontrados em animais que não foram tratados. Aparentemente, o número de neutrófilos foi reduzido após o tratamento com MK-886. A vacinação com o protocolo *prime-boost* (Figuras 10D e 11D) ou DNA-HSP65 (Figuras 10F e 11F), seguida do desafio, sem tratamento com MK-886, reduziu o infiltrado inflamatório nos pulmões. Animais imunizados pela estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com MK-886 (Figuras 10E e 11E) apresentaram uma pequena redução do infiltrado inflamatório nos pulmões, em relação aos animais infectados, não imunizados e tratados com MK-886 (Figura 10C). Os animais imunizados com a estratégia *prime-boost* (Figuras 10E e 11E) ou DNA-HSP65 (Figuras 10G e 11G), desafiados e tratados com MK-886, tiveram infiltrado inflamatório menor comparado àquele encontrado nos respectivos grupos imunizados, não tratados. Além disso, observou-se também hiperplasia de BALT e granulomas esparsos. No grupo de animais injetados com vetor pVAX e desafiados (Figuras 10H e 11H), observou-se que o infiltrado inflamatório foi menor que aquele encontrado em animais não imunizados e infectados (Figuras 10B e 11B), embora fossem encontrados granulomas multifocais e hiperplasia de BALT. O tratamento com MK-886 de animais injetados com pVAX e desafiados (Figuras 10I e 11I) não alterou o infiltrado celular nos pulmões em relação aos animais que não foram tratados (Figuras 10H e 11H). Estes animais apresentaram granulomas com grandes quantidades de macrófagos e hiperplasia de BALT.

Figura 8: Análise histológica dos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO), imunizados ou não (Aumento de 50x). Grupos de 7 animais foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10^5 bacilos / animal. Trinta dias após a infecção, o lóbulo superior direito dos pulmões foi coletado e corado com HE.

Descrição dos grupos: (A): animais WT não imunizados e não infectados; (B e C): WT e 5-LO KO, respectivamente, não imunizados e infectados; (D e E): WT e 5-LO KO, respectivamente, imunizados pelo esquema *prime-boost* e desafiados; (F e G): WT e 5-LO KO, respectivamente, imunizados com DNA-HSP65 e desafiados; (H e I): WT e 5-LO, respectivamente, que receberam o vetor pVAX e foram desafiados.

Figura 9: Análise histológica dos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO), imunizados ou não (Aumento de 400x). Grupos de 7 animais foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10^5 bacilos / animal. Trinta dias após a infecção, o lóbulo superior direito dos pulmões foi coletado e corado com HE.

Descrição dos grupos: (A): animais WT não imunizados e não infectados; (B e C): WT e 5-LO KO, respectivamente, não imunizados e infectados; (D e E): WT e 5-LO KO, respectivamente, imunizados pelo esquema *prime-boost* e desafiados; (F e G): WT e 5-LO KO, respectivamente, imunizados com DNA-HSP65 e desafiados; (H e I): WT e 5-LO, respectivamente, que receberam o vetor pVAX e foram desafiados.

Figura 10: Análise histológica dos pulmões de animais BALB/c imunizados ou não e tratados com MK-886 (Aumento de 50x). Grupos de 6 animais foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10^5 bacilos / animal. Uma hora antes e durante 30 dias após a infecção, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) ou água por via oral. Depois desse período, o lóbulo superior direito dos pulmões foi coletado e corado com HE.

Descrição dos grupos: (A): animais não imunizados e não infectados; (B): animais não imunizados, infectados, tratados com água; (C): animais não imunizados e infectados, tratados com MK-886; (D e F): animais imunizados com a estratégia *prime-boost* ou DNA-HSP65, respectivamente, desafiados e tratados com água; (E e G): animais imunizados com a estratégia *prime-boost* ou DNA-HSP65, respectivamente, desafiados e tratados com MK-886; (H): animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com água; (I): animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com MK-886.

Figura 11: Análise histológica dos pulmões de animais BALB/c imunizados ou não e tratados com MK-886 (Aumento de 400x). Grupos de 6 animais foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10^5 bacilos / animal. Uma hora antes e durante 30 dias após a infecção, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) ou água por via oral. Depois desse período, o lóbulo superior direito dos pulmões foi coletado e corado com HE.

Descrição dos grupos: (A): animais não imunizados e não infectados; (B): animais não imunizados, infectados, tratados com água; (C): animais não imunizados e infectados, tratados com MK-886; (D e F): animais imunizados com a estratégia *prime-boost* ou DNA-HSP65, respectivamente, desafiados e tratados com água; (E e G): animais imunizados com a estratégia *prime-boost* ou DNA-HSP65, respectivamente, desafiados e tratados com MK-886; (H): animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com água; (I): animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com MK-886.

Número absoluto de células CD4⁺ e CD8⁺ nos pulmões de animais WT ou 5-LO KO, imunizados ou não

Os resultados obtidos a partir das análises histopatológicas nos mostraram que de maneira geral, animais 5-LO KO infectados ou animais infectados tratados com MK-886 tiveram seu parênquima pulmonar mais preservado, com a presença de infiltrado inflamatório menor em relação aos animais WT ou não tratados, respectivamente. Para confirmar se a deficiência na produção de LT afeta o recrutamento de células para o pulmão, o número total de células obtidas após a digestão dos pulmões foi avaliado em animais WT ou deficientes para 5-LO imunizados com a estratégia *prime-boost* e desafiados com *M. tuberculosis*. Foi possível observar que a infecção de animais WT induziu aumento significativo do número de células totais nos pulmões comparando-se ao número de células encontrado em animais WT não imunizados e não infectados (dados não mostrados). Nos animais 5-LO KO infectados também se observou aumento significativo do número de células totais nos pulmões, em relação aos animais 5-LO KO não infectados. Animais WT imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados apresentaram números significativamente menores de células pulmonares totais em relação aos animais WT apenas infectados. Animais 5-LO KO infectados apresentaram número de células totais significativamente menores em relação aos animais WT (dados não mostrados), e a imunização com o *prime-boost* não alterou o número total de células nos pulmões dos animais 5-LO KO infectados.

Com intuito de determinar o número absoluto de células CD4⁺ e CD8⁺ nos pulmões, as células totais foram marcadas com anticorpos específicos para estes receptores. O número absoluto destas populações celulares foi calculado a partir do número de células totais do pulmão, o qual representa 100% da população de células e a partir da frequência de células CD4⁺ ou CD8⁺ detectadas nas amostras.

Animais WT não imunizados e infectados (*Mtb*) apresentaram aumento significativo do número de células CD4⁺ ou CD8⁺ em relação aos animais não imunizados, não infectados (branco) (Figuras 12A e 12B, respectivamente). A imunização de animais WT com a estratégia *prime-boost* (PB) resultou em diminuição no influxo de células CD4⁺ ou CD8⁺ em relação aos animais WT não imunizados e infectados (*Mtb*), sendo a redução estatisticamente significativa para células CD4⁺.

Animais deficientes para 5-LO não imunizados e infectados com *M. tuberculosis* (*Mtb*) também tiveram aumento significativo no número de células CD4⁺ ou CD8⁺ comparado aos animais 5-LO KO não imunizados, não infectados (branco). Entretanto, esse número de células CD4⁺ ou CD8⁺ foi significativamente menor que aquele encontrado em

pulmão de animais WT infectados (Mtb), como mostram as Figuras 12A e 12B, respectivamente. Da mesma forma de como foi observado nos animais WT, nos deficientes para 5-LO a imunização com a estratégia *prime-boost* seguida do desafio (PB) reduziu o número destas populações celulares nos pulmões em relação ao respectivo grupo infectado (Mtb). Porém, esta redução observada não foi estatisticamente significativa.

O número de células CD11b⁺ e CD11c⁺ recrutadas para os pulmões de animais WT ou 5-LO KO infectados com *M. tuberculosis* (Mtb) foi significativamente maior em relação aos detectados em animais WT ou 5-LO KO não infectados (branco) (Figuras 12C e 12D, respectivamente). A imunização com a estratégia *prime-boost* também reduziu o número destas populações celulares nos pulmões tanto de animais WT quanto de 5-LO KO desafiados em relação aos animais não imunizados e desafiados ($p>0,05$). Da mesma forma como foi observado para o influxo de células CD4⁺ e CD8⁺, o número total de células CD11b⁺ e CD11c⁺ nos pulmões de animais WT infectados foi maior em relação àquele de animais 5-LO KO infectados ($p>0,05$). Este efeito também ocorreu entre animais WT e 5-LO KO imunizados pelo *prime-boost* (Figuras 12C e 12D).

Figura 12: Número absoluto de células CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ e CD11c⁺ nos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) imunizados pela estratégia *prime-boost* (PB) e infectados. Os animais foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10⁵ bacilos / animal. Como controles, são apresentados resultados de grupos não imunizados e não infectados (branco) ou apenas infectados (Mtb). Trinta dias após a infecção, os pulmões foram digeridos para obtenção de suspensão de células pulmonares. O número absoluto de células CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), CD11b⁺ (C) e CD11c⁺ (D) foi determinado por citometria de fluxo. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão de dois experimentos independentes, no total de 3-5 animais avaliados. * p<0,05.

Número de células CD4⁺ e CD8⁺ no parênquima pulmonar de animais imunizados ou não, infectados e tratados com MK-886

O número de células CD4⁺ e CD8⁺ no parênquima pulmonar dos animais também foi avaliado por imunohistoquímica através da contagem do número total destas células determinado em 20 campos fotografados aleatoriamente.

A avaliação do lóbulo esquerdo dos pulmões por imunohistoquímica mostrou aumento de aproximadamente duas vezes no número de células CD4⁺ no parênquima de animais infectados com *M. tuberculosis* (Figuras 13A e 14A) em relação aos animais não infectados (branco) (Figura 14A). O tratamento com MK-886 de animais infectados inibiu parcialmente a migração desta população celular para os pulmões (Figuras 13B e 14A).

Animais BALB/c imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) (Figuras 13C e 14A) apresentaram número de células CD4⁺ menor àquele observado em animais não imunizados e infectados (Mtb) (Figuras 13A e 14A). O tratamento de animais imunizados pela estratégia *prime-boost* com MK-886 não alterou o número destas células presentes nos pulmões, em relação aos animais imunizados e não tratados (Figuras 13D e 14A). Resultados similares foram observados quando a imunização homóloga com DNA-HSP65 foi realizada (dados não mostrados).

O número de células CD8⁺ detectado no parênquima pulmonar de animais BALB/c infectados com *M. tuberculosis* (Mtb) (Figuras 13E e 14B) foi aproximadamente seis vezes maior em relação àquele detectado em animais não infectados (branco) (Figura 14B). O tratamento com MK-886 dos animais infectados (Mtb) (Figuras 13F e 14B) não modificou o número de células CD8⁺ nos pulmões, comparado ao de animais infectados e não tratados (Mtb) (Figuras 13EA e 14B). Animais BALB/c imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) (Figuras 13G e 14B) apresentaram números similares de células CD8⁺ no parênquima pulmonar, comparados aos detectados em animais apenas infectados (Figuras 13E e 14B). O tratamento com MK-886 de animais imunizados pelo *prime-boost* e desafiados (PB) (Figuras 13H e 14B) reduziu o número de células CD8⁺ nos pulmões. Resultados similares foram observados com a imunização DNA-HSP65 (dados não mostrados).

Figura 13: Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de células CD4⁺ (figuras A-D) e CD8⁺ (figuras E-H) no parênquima pulmonar de animais BALB/c. Os animais foram imunizados com a estratégia *prime-boost* conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10⁵ bacilos / animal. Uma hora antes e durante 30 dias após o desafio, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) ou água por via oral. Após esse período, o lóbulo esquerdo dos pulmões foi retirado e avaliado por imunoistoquímica quanto à expressão de CD4 (A-D) ou CD8 (E-H). Aumento de 400x.

Descrição dos grupos: (A e E): animais não imunizados, infectados, tratados com água; (B e F): animais não imunizados e infectados, tratados com MK-886; (C e G): animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com água; (D e H): animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com MK-886.

Figura 14: Número de células CD4⁺ e CD8⁺ detectadas por imunoistoquímica no parênquima pulmonar de animais BALB/c imunizados ou não pela estratégia *prime-boost* (PB) e tratados com MK-886. Animais BALB/c foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10⁵ bacilos / animal. Como controles, foram utilizados grupos não imunizados e não infectados (branco) ou apenas infectados (Mtb). Durante 30 dias após a infecção, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) (Mtb + MK-886) ou água (Mtb + água) por via oral. Após esse período, o lóbulo esquerdo dos pulmões foi retirado e avaliado por imunoistoquímica quanto ao número de células CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B). Resultados expressos como a média ± erro padrão da média do número total de células marcadas obtido de 20 campos fotografados aleatoriamente dos pulmões de 2-3 animais por grupo.

Produção de nitrito nos pulmões de animais imunizados ou não

A produção de nitrito foi avaliada, pois além do óxido nítrico estar associado com indução da morte dos bacilos (241), sua produção é estimulada por LTB₄ (171).

A Figura 15A mostra que animais 5-LO KO não imunizados e infectados com *M. tuberculosis* (salina) produziram nitrito em concentrações significativamente menores comparado aos animais WT infectados.

A produção de nitrito nos pulmões de animais WT imunizados tanto pela estratégia *prime-boost* (PB) como por DNA-HSP65 (DNA), e desafiados com *M. tuberculosis* foi significativamente menor comparada àquela detectada nos pulmões de animais não imunizados e infectados (salina) (Figura 15A). A imunização pela estratégia *prime-boost* resultou em redução das concentrações de nitrito de maneira mais acentuada comparada à imunização com DNA-HSP65.

Animais 5-LO KO imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB), DNA-HSP65 (DNA) ou que receberam pVAX (vetor) e foram desafiados, produziram concentrações de nitrito nos pulmões muito semelhantes àqueles detectados nos pulmões de animais 5-LO KO não imunizados e infectados (salina) (Figura 15A).

Uma análise comparativa entre a produção de nitrito nos pulmões de WT e 5-LO KO não imunizados e infectados, ou imunizados e desafiados, nos mostrou que a deficiência na produção de LT endógenos resultou em redução na produção deste mediador, sendo esta diferença significativa em animais imunizados com DNA-HSP65 (DNA) ou que receberam pVAX (vetor), comparado-se aos respectivos grupos controle (Figura 15A).

Animais BALB/c infectados com *M. tuberculosis* e tratados com MK-886 (salina) apresentaram produção de nitrito semelhante àquela detectada em animais infectados que não foram tratados (Figura 15B).

A imunização pela estratégia *prime-boost* (PB) ou com DNA-HSP65 (DNA) seguida do desafio reduziu a síntese de nitrito nos pulmões de animais infectados ($p > 0,05$) (Figura 15B). Nos animais que receberam pVAX e foram desafiados (vetor), a produção de nitrito foi similar àquela detectada nos animais não imunizados e infectados (salina).

Os grupos de animais que foram imunizados pela estratégia *prime-boost* (PB), DNA-HSP65 (DNA) ou que receberam pVAX (vetor) e foram desafiados e tratados com MK-886, não apresentaram modulação nas concentrações de nitrito detectadas nos pulmões, comparadas às detectadas em animais não imunizados, tratados com MK-886 e infectados (salina) (Figura 15B). Também não se observou diferença nas concentrações de nitrito de animais imunizados pela estratégia *prime-boost* (PB) ou que receberam o pVAX (vetor) e

foram desafiados (ambos os grupos tratados com MK-886) e os respectivos grupos de animais que não foram tratados com o composto. Verificou-se diferença apenas no grupo imunizado com DNA-HSP65, desafiado e tratado com MK-886 em relação ao grupo DNA-HSP65, sendo no primeiro grupo, concentrações significativamente maiores de nitrito encontradas.

Figura 15: Concentrações de nitrito nos pulmões de animais imunizados ou não pela estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA). (A) Animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) e (B) animais BALB/c foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização, os animais foram desafiados por via intratraqueal com 10^5 bacilos / animal. Alguns grupos foram apenas infectados (salina) ou receberam o vetor pVAX e foram desafiados (vetor). Durante trinta dias após a infecção, os animais BALB/c foram ou não tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) (Mtb + MK-886) ou água (Mtb + água) por via oral. Após esse período, o lóbulo esquerdo dos pulmões de ambos os grupos foi coletado, homogeneizado e a concentração de nitrito foi detectada pela reação de Greiss. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão de dois experimentos independentes (Grupos de 7-9 animais nos experimentos de WT ou 5-LO KO e 6-9 animais nos experimentos de BALB/c tratados com MK-886). * $p < 0,05$.

Produção de citocinas nos pulmões de animais imunizados ou não

Além de afetar o recrutamento de leucócitos, o bloqueio da síntese de LT também modula a produção de citocinas pró-inflamatórias e de citocinas que regulam a resposta imune (188). Desse modo, avaliamos as citocinas IFN- γ , IL-12 e IL-17 nos sobrenadantes de homogeneizados de pulmão de animais WT e 5-LO KO imunizados ou não e infectados, ou de animais BALB/c imunizados ou não, infectados e tratados com MK-886.

Na Figura 16A pode ser observado que a imunização de animais WT pela estratégia *prime-boost* seguida do desafio (PB) diminuiu significativamente as concentrações de IFN- γ detectadas em relação aos animais não imunizados e infectados (salina). A imunização homóloga de animais WT com DNA-HSP65 seguida do desafio (DNA) também reduziu as concentrações desta citocina comparadas aos animais WT não imunizados e infectados (salina) ($p > 0,05$). Os grupos de animais WT que receberam pVAX (vetor) e foram desafiados tiveram as concentrações de IFN- γ semelhantes às aquelas detectadas em pulmões de animais não imunizados e infectados (salina).

Os animais 5-LO KO, independente do grupo, apresentaram redução significativa na produção de IFN- γ quando comparada aos respectivos grupos WT (Figura 16A). Da mesma forma como foi observado para animais WT, o grupo dos animais 5-LO KO imunizados pelo esquema *prime-boost* e desafiados (PB) apresentou concentrações significativamente menores de IFN- γ em relação aos animais 5-LO KO infectados que não foram imunizados (salina) (média de 261 ± 52 pg/mL de IFN- γ em 5-LO KO não-imunizados e 129 ± 15 pg/mL no grupo imunizado pelo *prime-boost*). Animais 5-LO KO imunizados com DNA-HSP65 e desafiados (DNA) também apresentaram redução, porém não significativa, das concentrações de IFN- γ nos pulmões quando comparadas às de animais 5-LO KO não imunizados e infectados (salina) (média de 261 ± 52 pg/mL de IFN- γ em 5-LO KO não imunizados e infectados e 177 ± 27 pg/mL no grupo imunizado com DNA-HSP65 e infectado). Os animais 5-LO KO que receberam pVAX e foram desafiados (vetor) também apresentaram concentrações de IFN- γ menores em relação às de animais não imunizados e infectados ($p > 0,05$) (média de 261 ± 52 pg/mL de IFN- γ em 5-LO KO não imunizados e desafiados e 184 ± 41 pg/mL no grupo injetado com pVAX e desafiado).

A Figura 16B mostra a produção de IFN- γ quando foi usada a estratégia para bloquear a síntese de LT com o composto MK-886. Animais BALB/c infectados com *M. tuberculosis* e tratados com MK-886 (salina) apresentaram concentrações menores, porém não significativas, de IFN- γ em relação às de animais infectados que não foram tratados.

A imunização de animais BALB/c tanto com a estratégia *prime-boost* (PB) como com DNA-HSP65 (DNA) seguida do desafio, reduziu significativamente a produção de IFN- γ nos pulmões em relação a animais infectados que não foram imunizados (salina). Os grupos que receberam pVAX não modularam significativamente a produção desta citocina nos pulmões.

Animais infectados que foram previamente imunizados com a estratégia *prime-boost* e tratados com MK-886 (PB) apresentaram concentrações de IFN- γ nos pulmões significativamente menores em relação àsquelas de animais não imunizados, tratados e infectados (Figura 16B). Porém, este efeito não foi observado em animais imunizados com DNA-HSP65, infectados e tratados com MK-886 (DNA), já que a produção de IFN- γ detectada foi semelhante àquela de animais não imunizados, infectados e tratados (salina). As concentrações de IFN- γ detectadas nos grupos de animais que receberam pVAX e foram infectados e tratados com MK-886 (vetor) foram muito semelhantes àsquelas detectadas no grupo de animais não imunizados, tratados e infectados (salina).

O tratamento com MK-886 de animais imunizados pelo esquema *prime-boost* e infectados (PB) reduziu a produção de IFN- γ em relação aos animais imunizados, não tratados (PB) ($p>0.05$). Entretanto, o tratamento com MK-886 de animais imunizados com DNA-HSP65 e infectados (DNA) aumentou discretamente a produção de IFN- γ quando comparados à de animais imunizados e infectados que não receberam tratamento.

Animais WT imunizados pelo esquema *prime-boost* e desafiados (PB) apresentam concentrações significativamente maiores de IL-12 nos pulmões, em relação aos animais WT não imunizados e infectados (salina) (Figura 16C). Animais WT que foram imunizados com DNA-HSP65 (DNA) ou que receberam o vetor pVAX (vetor) e foram desafiados, apresentaram concentrações semelhantes de IL-12 nos pulmões em relação aos animais não imunizados e infectados (salina).

Animais 5-LO KO imunizados pelo esquema *prime-boost* (PB), DNA-HSP65 (DNA) ou que receberam pVAX (vetor) e foram desafiados com *M. tuberculosis* apresentaram concentrações pulmonares de IL-12 semelhantes às detectadas nos animais 5-LO KO não imunizados e infectados (salina) (Figura 16C).

As concentrações de IL-12 detectadas nos pulmões dos animais 5-LO KO não imunizados e infectados (salina), em animais imunizados com DNA-HSP65 (DNA) ou que receberam pVAX (vetor), e foram desafiados, foram semelhantes às detectadas nos respectivos grupos de animais WT (Figura 16C). Os animais WT imunizados com a estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) secretaram concentrações maiores de IL-12 em relação aos 5-LO KO imunizados e desafiados ($p>0,05$).

A imunização com o esquema *prime-boost* (PB) ou com DNA-HSP65 (DNA) dos animais BALB/c infectados reduziu significativamente as concentrações de IL-12 no pulmão em relação aos grupos infectados que não foram imunizados (salina) (Figura 16D). Porém, a redução induzida pela imunização com a estratégia *prime-boost* foi maior comparada à imunização com DNA-HSP65. Animais que receberam o vetor pVAX (vetor) produziram concentrações de IL-12 semelhantes às detectadas em animais apenas infectados.

Da mesma forma de como foi observado na presença de LT endógenos, animais BALB/c imunizados pelo *prime-boost* e tratados com MK-886 também apresentaram uma redução significativa na produção de IL-12, quando comparada à detectada em animais infectados, tratados e que não foram imunizados (salina) (Figura 16D). Porém, a imunização com DNA-HSP65 não alterou a produção de IL-12 nos grupos tratados com MK-886.

Animais BALB/c infectados com *M. tuberculosis* e tratados com MK-886 (salina) apresentaram discreta redução das concentrações de IL-12 nos pulmões em relação aos animais infectados não tratados. Nos grupos de animais tratados com MK-886, observou-se pequeno aumento nas concentrações de IL-12 nos pulmões de animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, DNA-HSP65 ou que receberam pVAX, em relação a animais imunizados que não foram tratados (Figura 16D).

A Figura 16E mostra que animais WT desafiados e previamente imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA) apresentaram concentrações significativamente menores de IL-17 em relação às detectadas em animais WT apenas infectados (salina). Os animais WT infectados que receberam o vetor pVAX (vetor) também apresentaram redução, embora não significativa, das concentrações de IL-17 em relação aos animais WT infectados (Figura 16E).

Animais 5-LO KO não imunizados e infectados (salina) apresentaram concentrações significativamente menores de IL-17 em relação aos animais WT não imunizados e infectados (Figura 16E). Diferente do observado nos animais WT, animais 5-LO KO imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) apresentaram aumento significativo das concentrações de IL-17 em relação aos 5-LO KO não imunizados e infectados (Figura 16E). A secreção de IL-17 em animais 5-LO KO imunizados pela estratégia *prime-boost* (PB) e desafiados foi maior que aquela de animais WT que também receberam imunização heteróloga e foram desafiados ($p < 0,05$).

A imunização de 5-LO KO com DNA-HSP65 (DNA) ou injeção do vetor pVAX (vetor) seguida do desafio induziu concentrações semelhantes de IL-17 em relação aos animais 5-LO KO não imunizados e infectados (salina). As concentrações de IL-17 detectadas nos pulmões de animais 5-LO KO imunizados com DNA-HSP65 e desafiados

(DNA) também foram semelhantes às detectadas em animais WT imunizados com DNA-HSP65 e desafiados. Os animais 5-LO KO que receberam o vetor pVAX e foram infectados secretaram menos IL-17 que os animais WT que também receberam pVAX e foram infectados ($p>0,05$).

Os animais BALB/c que foram imunizados com a estratégia *prime-boost*, DNA-HSP65 ou receberam o vetor pVAX e foram desafiados (não tratados com MK-886) (grupos PB, DNA e vetor, respectivamente), apresentaram concentrações de IL-17 semelhantes às detectadas em animais não imunizados e infectados (salina) (Figura 16F).

As concentrações de IL-17 detectadas nos pulmões de animais BALB/c imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com MK-886 (PB) foram significativamente maiores em relação às detectadas em BALB/c não imunizados, infectados e tratados (salina) (Figura 16F). A imunização com DNA-HSP65 (DNA) ou a administração de vetor pVAX (vetor), seguidos do desafio e tratamento com MK-886, não afetou a produção de IL-17 nos pulmões, em relação aos animais não imunizados, infectados e tratados (salina). A comparação entre a produção de IL-17 nos pulmões de animais imunizados pelo esquema *prime-boost* ou com DNA-HSP65, desafiados e tratados com MK-886 e a produção nos respectivos grupos imunizados, desafiados e não tratados, não mostrou diferença. Apenas os animais que receberam o vetor pVAX e foram desafiados e tratados com MK-886 apresentaram concentrações significativamente maiores de IL-17 em relação ao mesmo grupo que não recebeu tratamento (Figura 16F).

Em síntese, os animais 5-LO KO infectados por *M. tuberculosis* secretaram concentrações menores de IFN- γ e IL-17, em relação aos animais WT infectados. A imunização com estratégia *prime-boost* aumentou significativamente a produção de IL-17 por animais 5-LO KO, em relação aos animais WT imunizados ou aos 5-LO KO infectados e não imunizados. Animais BALB/c infectados e tratados com MK-886 também secretaram concentrações menores de IFN- γ em relação aos animais infectados não tratados. A imunização pelo *prime-boost* aumentou significativamente a produção de IL-17 por animais BALB/c infectados e tratados com MK-886, em relação aos animais não imunizados, infectados e tratados.

Figura 16: Concentrações de citocinas nos pulmões de animais imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA). Animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) (A, C e E) e animais BALB/c (B, D e F) foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10^5 bacilos / animal). Alguns grupos foram apenas infectados (salina) ou receberam o vetor pVAX e foram desafiados (vetor). Durante trinta dias após a infecção, os animais BALB/c foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) (Mtb + MK-886) ou água (Mtb + água) por via oral. Após esse período, o lóbulo esquerdo dos pulmões de ambos os grupos foi coletado, homogeneizado e as concentrações de IFN- γ , IL-12 e IL-17 foram detectadas por ELISA. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes (Grupos de 4-9 animais nos experimentos de WT ou 5-LO KO e 5-9 animais nos experimentos de BALB/c tratados com MK-886). * $p < 0,05$.

Quantificação por imunistoquímica de IFN- γ e IL-4 nos pulmões de animais imunizados ou não e tratados com MK-886

Com o intuito de confirmar os resultados anteriores e também de avaliar a produção de IL-4, pulmões de animais imunizados, infectados e tratados com MK-886 foram avaliados. Os resultados são representados como a porcentagem da área total de marcação para cada citocina detectada em 20 campos fotografados aleatoriamente dos pulmões de cada animal.

Animais não imunizados e infectados com *M. tuberculosis* (salina) (Figuras 17A e 17I) apresentaram marcação para IFN- γ em aproximadamente 4% da área pulmonar total avaliada. O tratamento destes animais com MK-886 reduziu em aproximadamente quatro vezes a área de marcação para esta citocina (Figuras 17B e 17I). A imunização de animais BALB/c com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA), seguida do desafio (Figuras 17C e 17E, respectivamente), reduziu a área de marcação para IFN- γ em relação aos animais infectados que não foram imunizados (Figuras 17A e 17I). O mesmo foi observado para os animais que receberam pVAX (vetor) (Figuras 17G e 17I). O tratamento com MK-886 de animais imunizados pelo esquema *prime-boost* seguido do desafio (Figuras 17D e 17I) não alterou a marcação para esta citocina em relação à marcação detectada em animais imunizados e desafiados que não foram tratados (Figuras 17C e 17I). O tratamento com MK-886 aumentou em quase duas vezes a marcação para IFN- γ nos grupos imunizados com DNA-HSP65 e desafiados (Figuras 17F e 17I) em relação ao grupo imunizado e desafiado que não recebeu tratamento (Figuras 17E e 17I). O tratamento com MK-886 de animais que receberam pVAX e foram desafiados (Figuras 17H e 17I) foi semelhante àquele observado em animais não tratados que receberam pVAX e foram desafiados (Figuras 17G e 17I).

A análise da marcação para IL-4 é apresentada na Figura 18. Animais não imunizados infectados por *M. tuberculosis* (salina) (Figuras 18A e 18I) apresentaram aproximadamente 5% da área total do pulmão marcada com IL-4. O tratamento com MK-886 deste grupo (Figuras 18B e 18I) reduziu em mais de quatro vezes a produção de IL-4. Animais que foram imunizados pela estratégia *prime-boost* (PB), DNA-HSP65 (DNA) ou pVAX (vetor), sendo em seguida desafiados e não tratados (Figuras 18C, 18E e 18G, respectivamente), apresentaram redução em mais de três vezes na marcação para IL-4, em relação aos animais não imunizados, infectados e não tratados (Figuras 18A e 18I). Porém, os efeitos na expressão da IL-4 observados após o tratamento com MK-886 dos grupos imunizados pelo *prime-boost* ou DNA-HSP65 e desafiados (Figuras 18D e 18F, respectivamente) foram diferentes. O tratamento com MK-886 de animais imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) (Figuras 18D e 18I) reduziu ainda mais a expressão de IL-4 em relação aos

animais imunizados, desafiados e não tratados (Figuras 18C e 18I). Já no grupo imunizado com DNA-HSP65, desafiado e tratado com MK-886 (DNA) (Figuras 18F e 18I), não foi observada alteração na expressão de IL-4 em relação aos animais imunizados e desafiados que não receberam tratamento (Figuras 18E e 19I). A expressão de IL-4 nos animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com MK-886 (vetor) (Figuras 18H e 18I) foi semelhante àquela detectada no respectivo grupo que não recebeu tratamento (Figuras 18G e 18I).

Em resumo, verificamos que animais BALB/c infectados por *M. tuberculosis* e tratados com MK-886 apresentaram uma redução na produção de IFN- γ e IL-4, em relação aos animais infectados não tratados. O resultado da produção de IFN- γ por imunoistoquímica foi concordante com aquele obtido a partir da dosagem por ELISA nos homogeneizados dos pulmões dos animais (Figura 16B). A imunização com a estratégia *prime-boost* ou DNA-HSP65 reduziu a área de marcação de IFN- γ e IL-4 nos animais desafiados (não tratados), em relação aos animais infectados e não imunizados. Por outro lado, a imunização pela estratégia *prime-boost* ou DNA-HSP65 de animais desafiados e tratados com MK-886 aumentou a área de marcação para IFN- γ , quando comparada à de animais infectados e tratados com MK-886 (não imunizados).

Figura 17: (A-H) Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de IFN- γ no parênquima pulmonar de animais BALB/c. Os animais foram imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA) conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Alguns grupos foram apenas infectados (salina) ou receberam o vetor pVAX e foram desafiados (vetor). Uma hora antes e durante 30 dias após o desafio, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) (Mtb + MK-886) ou água (Mtb + água) por via oral. Após esse período, o lóbulo esquerdo dos pulmões foi retirado e avaliado por imunoistoquímica quanto à expressão de IFN- γ . Aumento de 200x. **(I)** Área total de marcação para IFN- γ no parênquima pulmonar de animais imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA). Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da área de marcação total detectada nos pulmões de 2-3 animais em 20 campos fotografados aleatoriamente.

Descrição dos grupos: (A): animais não imunizados, infectados, tratados com água; (B): animais não imunizados e infectados, tratados com MK-886; (C): animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com água; (D): animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com MK-886; (E): animais imunizados com DNA-HSP65, desafiados e tratados com água; (F): animais imunizados com DNA-HSP65, desafiados e tratados com MK-886; (G): animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com água; (H): animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com MK-886.

Figura 18: (A-H) Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de IL-4 no parênquima pulmonar de animais BALB/c. Os animais foram imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA) conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Alguns grupos foram apenas infectados (salina) ou receberam o vetor pVAX e foram desafiados (vetor). Uma hora antes e durante 30 dias após o desafio, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) (Mtb + MK-886) ou água (Mtb + água) por via oral. Após esse período, o lóbulo esquerdo dos pulmões foi retirado e avaliado por imunoistoquímica quanto à expressão de IL-4. Aumento de 200x. **(I)** Área total de marcação para IL-4 no parênquima pulmonar de animais imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA). Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da área de marcação total detectada nos pulmões de 2-3 animais em 20 campos fotografados aleatoriamente.

Descrição dos grupos: (A): animais não imunizados, infectados, tratados com água; (B): animais não imunizados e infectados, tratados com MK-886; (C): animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com água; (D): animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com MK-886; (E): animais imunizados com DNA-HSP65, desafiados e tratados com água; (F): animais imunizados com DNA-HSP65, desafiados e tratados com MK-886; (G): animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com água; (H): animais que receberam pVAX, foram desafiados e tratados com MK-886.

Análise do número e função supressora de células Treg de animais WT ou 5-LO KO imunizados

Observamos na Figura 7B que animais 5-LO KO infectados (imunizados ou não) secretavam altas concentrações de PGE_2 , quando comparados aos animais WT. Uma vez que foi descrito que PGE_2 contribui na expansão e função supressora de células Treg, nós levantamos a hipótese de que a imunização com estratégia *prime-boost* poderia induzir a diferenciação de células Treg de maneira diferencial em animais WT ou 5-LO KO. Para testar esta hipótese, nós avaliamos o número e a função supressora de células Foxp3^+ no baço de animais WT ou 5-LO KO imunizados pela estratégia *prime-boost*.

A Figura 19 mostra a expressão de Foxp3 nas células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ isoladas do baço dos animais WT ou 5-LO KO imunizados. É possível observar que aproximadamente 90% dos linfócitos purificados de ambos os grupos eram $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$, e que a grande maioria destas células (95% para animais WT e 92% para animais 5-LO KO) expressavam o fator de transcrição Foxp3 (Figura 19). Com este resultado confirmamos a eficácia do processo de isolamento das células Treg do baço dos animais.

Após terem sido isoladas do baço, as células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ dos animais WT ou 5-LO KO imunizados foram contadas na Câmara de Neubauer. A Figura 20A mostra que tanto animais WT quanto 5-LO KO apresentaram números semelhantes de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ após a imunização com a estratégia *prime-boost*.

Para avaliar a função supressora das células Treg, as células isoladas do baço de animais WT ou de 5-LO KO imunizados pela estratégia *prime-boost* foram transferidas para animais WT não imunizados. Os animais WT que receberam as células Treg foram então desafiados com *M. tuberculosis* e trinta dias depois do desafio a UFC foi avaliada nos pulmões e baço.

Os animais WT que receberam células Treg provenientes de animais WT imunizados (Treg WT) e foram em seguida desafiados, apresentaram números de UFC nos pulmões e baço semelhantes àqueles detectados em animais WT que receberam células Treg provenientes de animais 5-LO KO imunizados (Treg KO) e foram desafiados (Figura 20B e 20C), assim como de animais WT que foram apenas infectados (WT).

Os resultados obtidos com estes ensaios sugerem que a imunização de animais 5-LO KO ou WT com a estratégia *prime-boost* não induziu números diferentes de células Treg, e que as células Treg diferenciadas em ambos os grupos após a imunização apresentaram função supressora semelhante.

Figura 19: Expressão de Foxp3 em células $CD4^+CD25^+$ purificadas do baço de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO). Os animais (n=5) foram submetidos ao protocolo de imunização *prime-boost* (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização as células $CD4^+CD25^+$ do baço foram separadas com o uso de esferas magnéticas, conforme descrito em *Materiais e métodos*. Antes de serem transferidas para animais WT, as células foram avaliadas quanto à expressão de Foxp3 intracelular. Inicialmente, foi criada a *gate* R1 envolvendo todas as células com tamanho e granularidade características de linfócitos. Em seguida, criou-se a *gate* R2, constituindo as células $CD4^+CD25^+$ presentes dentro de R1. A frequência de células Foxp3⁺ foi avaliada dentro da população celular $CD4^+CD25^+$ por histograma.

Figura 20: (A) Número total de células Treg obtidas dos baços de animais WT e 5-LO KO imunizados pela estratégia prime-boost. Os animais foram submetidos ao protocolo de imunização por *prime-boost* e trinta dias após a última imunização as células CD4⁺CD25⁺ do baço foram separadas com o uso de esferas magnéticas, conforme descrito em *Materiais e métodos*. As células Treg totais foram contadas em Câmara de Neubauer. Resultados expressos como média ± erro padrão da média de 6-7 animais. (B) e (C): Crescimento de *M. tuberculosis* nos pulmões (B) e baço (C) de animais WT que receberam células Treg provenientes de animais WT [grupo (WT + Treg (WT))] ou de 5-LO KO [grupo WT + Treg (KO)] imunizados pela estratégia *prime-boost* (*Material e métodos*, página 47). O grupo indicado apenas por WT representa animais infectados que não receberam Treg. Resultados expressos como média ± erro padrão da média de 2-6 animais.

Papel das PG na expansão de células Treg e no efeito protetor induzido pela imunização com a estratégia *prime-boost*

Para avaliar o papel das PG na expansão de células Treg e no efeito protetor induzido pela imunização com a estratégia *prime-boost*, animais WT ou 5-LO KO foram submetidos ao protocolo de imunização por *prime-boost*. Uma hora antes da injeção da vacina BCG e durante 45 dias subseqüentes, os animais foram tratados diariamente com celecoxib, inibidor da síntese de PG. Trinta dias após a imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* e 30 dias após o desafio, o número de UFC e de células Foxp3⁺ foi avaliado nos pulmões e nos baços.

Conforme esperado, animais 5-LO KO infectados com *M. tuberculosis* (salina) apresentaram número de UFC nos pulmões maior que aqueles detectados em animais WT infectados (Figura 21A). Porém, a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa. A estratégia de imunização pelo *prime-boost* (PB) reduziu significativamente o número de UFC nos pulmões de animais WT desafiados.

Animais 5-LO KO imunizados pela estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) apresentaram números menores de bacilos nos pulmões, em relação aos 5-LO KO infectados e não imunizados (Figura 21A) ($p>0,05$).

O tratamento com celecoxib dos animais WT antes de serem infectados com *M. tuberculosis* (salina + celecoxib) não afetou o crescimento do bacilo, uma vez que a UFC detectada neste grupo foi semelhante à detectada no grupo WT infectado não tratado (salina) (Figura 21A). A inibição da síntese de PG durante o período de imunização reduziu o efeito protetor do *prime-boost*, uma vez que o número de UFC detectado nos pulmões de animais WT imunizados, tratados com celecoxib e desafiados (PB + celecoxib) foi semelhante àquele detectado em animais WT não imunizados, infectados e tratados com celecoxib (salina + celecoxib) (Figura 21A). O tratamento com celecoxib antes da infecção também não alterou o número de UFC nos pulmões de animais 5-LO KO, uma vez que o número de UFC detectado nos pulmões destes animais (salina + celecoxib) foi semelhante aos de animais 5-LO KO infectados e não tratados (salina) (Figura 21A). Da mesma forma do que foi observado nos grupos WT, animais 5-LO KO tratados com celecoxib durante a imunização e infectados (PB + celecoxib), apresentaram UFC semelhante ao grupo 5-LO KO infectado e não imunizado (salina + celecoxib).

O número de bacilos detectados no baço de animais 5-LO KO infectados foi semelhante àquele de animais WT infectados (salina) (Figura 21B). A imunização de animais WT com a estratégia *prime-boost* (PB) seguida do desafio, não foi capaz de reduzir

significativamente o número de UFC no baço dos animais, em comparação aos animais WT infectados e não imunizados (Figura 21B). A estratégia *prime-boost* reduziu, não significativamente, o número de UFC no baço de animais 5-LO KO infectados (PB), em comparação ao número de UFC detectado em animais 5-LO KO infectados e não imunizados (salina).

O tratamento com celecoxib antes do desafio dos animais com *M. tuberculosis* não alterou o crescimento do bacilo no baço de animais WT ou 5-LO KO, uma vez que o número de UFC no baço de animais WT ou 5-LO KO tratados e desafiados (salina + celecoxib) foi semelhante àquele de animais WT ou 5-LO KO não tratados e desafiados (salina) (Figura 21B). O tratamento dos animais WT com celecoxib durante o período de imunização (PB + celecoxib) reduziu significativamente o número de UFC no baço, em relação aos animais WT imunizados e não tratados (PB). O mesmo não foi observado nos grupos de 5-LO KO, onde grupos de animais 5-LO KO tratados com celecoxib durante a imunização e desafiados (PB + celecoxib), apresentaram número de UFC semelhante àquele detectado em animais 5-LO KO não tratados e imunizados (PB).

Figura 21: Crescimento de *M. tuberculosis* em animais WT ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) e tratados com celecoxib. Grupos de 2-5 animais WT ou 5-LO KO foram imunizados conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Alguns grupos foram apenas infectados (salina). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10^5 bacilos / animal. Durante o período de imunização, os animais foram tratados diariamente com celecoxib (5mg / kg) (salina + celecoxib ou PB + celecoxib) ou água (salina ou PB) por via oral. Trinta dias depois da infecção, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi avaliado nos pulmões (A) e nos baços (B) de ambos os grupos. Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$.

Além do crescimento do bacilo, o número de células Foxp3⁺ também foi avaliado nos pulmões dos animais tratados com celecoxib durante o protocolo de imunização pelo *prime-boost*.

Observamos que animais deficientes para 5-LO não imunizados e infectados com *M. tuberculosis* (salina) (Figuras 22B e 22I) apresentaram número significativamente maior de células Foxp3⁺ nos pulmões, em relação aos animais WT (Figuras 22A e 22I). A imunização de animais WT com a estratégia *prime-boost* seguida do desafio (PB) (Figuras 22C e 22I) também aumentou significativamente o número de células Foxp3⁺ nos pulmões em relação aos animais WT infectados que não foram imunizados (salina) (Figuras 22A e 22I). Animais 5-LO KO imunizados com a estratégia *prime-boost* e desafiados (PB) (Figuras 22D e 22I) apresentaram números de células Foxp3⁺ significativamente menor em relação aos animais 5-LO KO infectados que não foram imunizados (salina) (Figuras 22B e 22I). O número de células Foxp3⁺ detectado nos pulmões de animais 5-LO KO imunizados pela estratégia *prime-boost* foi semelhante àquele de animais WT imunizados pelo *prime-boost* e desafiados.

O perfil de expressão de células Foxp3⁺ nos pulmões dos animais tratados com celecoxib ficou semelhante àquele obtido para UFC. O tratamento de animais WT com celecoxib antes da infecção com *M. tuberculosis* (salina + celecoxib) (Figuras 22E e 22I) não alterou o número de células Foxp3⁺ nos pulmões, uma vez que este grupo apresentou número de células Foxp3⁺ semelhantes àqueles dos grupos WT não tratados e infectados (salina) (Figuras 22A e 22I). O tratamento de animais WT com celecoxib durante o período de imunização seguido do desafio (PB + celecoxib) (Figuras 22G e 22I) resultou em números semelhantes de células Foxp3⁺ nos pulmões, quando comparados aos de animais WT imunizados, desafiados e não tratados (PB) (Figuras 22C e 22I).

Assim como foi visto nos animais WT, o tratamento de animais 5-LO KO com celecoxib antes da infecção com *M. tuberculosis* (salina + celecoxib) (Figuras 22F e 22I) resultou em números semelhantes de células Foxp3⁺ nos pulmões, quando comparados aos de animais 5-LO KO infectados e não tratados (salina) (Figuras 22B e 22I). No mesmo sentido, animais 5-LO KO imunizados e desafiados (Figuras 22D e 22I) apresentaram números semelhantes de células Foxp3⁺ nos pulmões quando comparados aos de animais 5-LO KO infectados que foram tratados com celecoxib durante o período de imunização (Figuras 22H e 22I).

Figura 22: (A-H) Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de células Foxp3^+ nos pulmões de animais selvagens (WT) ou deficientes para 5-LO (5-LO KO) imunizados ou não. Os animais foram imunizados pelo esquema *prime-boost* conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Durante o período de imunização, os animais foram tratados diariamente com celecoxib (5mg / kg) (salina + celecoxib ou PB + celecoxib) ou água (salina ou PB) por via oral. Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 10^5 bacilos / animal. Alguns grupos foram apenas infectados (salina). Trinta dias depois do desafio, o lóbulo esquerdo dos pulmões de todos os grupos foi retirado e avaliado por imunoistoquímica quanto ao número de células Foxp3^+ . Aumento de 400x. **(I)** Número total de células Foxp3^+ no parênquima pulmonar de animais imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB). Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da área de marcação total detectada nos pulmões de 4-5 animais em 20 campos fotografados aleatoriamente. * $p < 0,05$.

Descrição dos grupos: (A): animais WT não imunizados, tratados com água e infectados; (B): animais 5-LO KO não imunizados, tratados com água e infectados; (C): animais WT imunizados com a estratégia *prime-boost*, tratados com água e desafiados; (D): animais 5-LO KO imunizados com a estratégia *prime-boost*, tratados com água e desafiados; (E): animais WT não imunizados, tratados com celecoxib e infectados; (F): animais 5-LO KO não imunizados, tratados com celecoxib e infectados; (G): animais WT imunizados com a estratégia *prime-boost*, tratados com celecoxib e desafiados; (H): animais 5-LO KO imunizados com a estratégia *prime-boost*, tratados com celecoxib e desafiados.

Quantificação de células Foxp3⁺ por imunoistoquímica nos pulmões de animais tratados ou não com MK-886

Assim como foi demonstrado por Oliveira e Paula e colaboradores (102), os resultados anteriores da avaliação do número de células Foxp3⁺ nos pulmões dos animais 5-LO KO também sugerem que estas células sejam responsáveis pela maior suscetibilidade destes animais à infecção por *M. tuberculosis* e pela redução do potencial protetor da estratégia *prime-boost*. Assim, avaliamos também o número de células Foxp3⁺ nos pulmões de animais imunizados e infectados, tratados ou não com MK-886.

A contagem do número de células Foxp3⁺ no parênquima pulmonar de animais infectados com *M. tuberculosis* e tratados com MK-886 (Figuras 23B e 23G) foi mais de três vezes maior quando comparada à de animais infectados não tratados (salina) (Figuras 23A e 23G). Animais imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou com DNA-HSP65 (DNA) e desafiados (Figuras 23C e 23E, respectivamente) apresentaram número semelhante de células Foxp3⁺ nos pulmões em relação aos animais infectados que não foram imunizados (salina) (Figuras 23A e 23G).

Nos grupos de animais imunizados pelo *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA), desafiados e tratados com MK-886 (Figuras 23D e 23F, respectivamente), observou-se uma redução do número de células Foxp3⁺ nos pulmões, em relação aos grupos infectados e tratados que não foram imunizados (salina) (Figuras 23C, 23E e 23G). Animais imunizados com o protocolo de *prime-boost* ou DNA-HSP65, desafiados e tratados com MK-886 apresentaram aproximadamente duas vezes mais células Foxp3⁺ nos pulmões, em relação aos respectivos grupos imunizados que não foram tratados (Figura 23G).

Figura 23: (A-H) Micrografias representativas da imunoistoquímica para detecção de células Foxp3^+ no parênquima pulmonar de animais BALB/c. Os animais foram imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA) conforme o delineamento experimental (*Material e métodos*, página 47). Trinta dias após a última imunização foram desafiados por via intratraqueal com 1×10^5 bacilos / animal. Alguns grupos foram apenas infectados (salina). Uma hora antes e durante 30 dias após o desafio, os animais foram tratados diariamente com MK-886 (5mg / kg) (Mtb + MK-886) ou água (Mtb + água) por via oral. Após esse período, o lóbulo esquerdo dos pulmões foi retirado e avaliado por imunoistoquímica quanto à expressão de Foxp3. Aumento de 400x. **(G)** Número total de células Foxp3^+ no parênquima pulmonar de animais imunizados com a estratégia *prime-boost* (PB) ou DNA-HSP65 (DNA). Resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão da número total de células Foxp3^+ detectada nos pulmões de 2-3 animais em 20 campos fotografados aleatoriamente.

Descrição dos grupos: (A): animais não imunizados, infectados, tratados com água; (B): animais não imunizados e infectados, tratados com MK-886; (C): animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com água; (D): animais imunizados com a estratégia *prime-boost*, desafiados e tratados com MK-886; (E): animais imunizados com DNA-HSP65, desafiados e tratados com água; (F): animais imunizados com DNA-HSP65, desafiados e tratados com MK-886.

5. Discussão

A existência de linhagens de camundongos com suscetibilidade distinta à infecção por *M. tuberculosis* já foi descrita em alguns estudos (242-244). Embora a maioria deles descreva tanto a linhagem C57BL/6 quanto a linhagem BALB/c como resistentes à infecção por micobactérias, existem estudos mostrando que a linhagem BALB/c pode ser mais suscetível à infecção, em relação à C57BL/6. Como exemplo, Yoshida e colaboradores mostraram a indução de resposta imune adaptativa protetora após infecção por BCG em animais C57BL/6, mas não em animais BALB/c (245). Ainda, a infecção de animais BALB/c com BCG induziu uma resposta Th1 menos intensa que aquela desenvolvida em animais C57BL/6 infectados (246), sugerindo que os animais BALB/c sejam mais suscetíveis à infecção em relação aos C57BL/6. Recentemente, nosso grupo mostrou que camundongos BALB/c e C57BL/6 possuem capacidade distinta em controlar a infecção por *M. tuberculosis*, sendo os últimos mais eficientes em restringir o crescimento de bacilos na fase tardia (setenta dias). Além disso, ambas as linhagens também apresentaram diferenças quanto à frequência de células T reguladoras (Treg) e ao potencial supressor dessas células, sugerindo que células Treg podem representar um fator de suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis* nos animais BALB/c (102).

Nos últimos anos, diversos estudos descreveram a importância de mediadores lipídicos, como o LTB₄, nos processos infecciosos e inflamatórios (132-134, 171, 177, 188, 247). Na infecção por *M. tuberculosis*, Peres e colaboradores (188) mostraram que o bloqueio na síntese de LT tornou animais BALB/c mais suscetíveis, enquanto Bafica e colaboradores (189) mostraram menor progressão da infecção em animais deficientes para a síntese de LT (5-LO KO). Diante destes dados, nós avaliamos se os LT desempenhavam também função na capacidade distinta dos animais BALB/c e C57BL/6 em controlar a infecção por *M. tuberculosis*. Embora os animais BALB/c secretassem maiores concentrações de LTB₄ espontaneamente, os animais C57BL/6, após a infecção, passavam a secretar concentrações maiores comparados aos BALB/c (Figura 1). Considerando os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa e os dados referentes à síntese de LT por animais de linhagens distintas, nós sugerimos a participação desses mediadores lipídicos na proteção contra a infecção por *M. tuberculosis*, como descrito por Peres e colaboradores (188). Quando a síntese de LT foi inibida por MK-886 na fase inicial da infecção (trinta dias), os animais BALB/c não controlaram a infecção quando comparados aos animais C57BL/6, enquanto a inibição da produção na fase tardia (setenta dias) tornou os animais C57BL/6 suscetíveis (Figura 2). Estes resultados reforçam ainda mais o papel dos LT na proteção contra tuberculose experimental e confirmam que a inibição na síntese desses mediadores está associada ao aumento na suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis*.

Sendo os LT relacionados com proteção e a ausência dos mesmos com suscetibilidade, passamos a avaliar a participação desses mediadores na eficácia protetora induzida pela imunização homóloga com DNA-HSP65 ou heteróloga (*prime-boost*) com BCG subcutâneo / DNA-HSP65 intramuscular.

Primeiramente nós constatamos que animais 5-LO KO eram mais suscetíveis à infecção que os animais WT. Resultado similar foi obtido quando animais foram tratados com MK-886 e infectados com *M. tuberculosis*, confirmando os dados já descritos por Peres e colaboradores (188). O aumento na suscetibilidade estava relacionado com diminuição na produção de IFN- γ e nitrito e, como esperado, menor capacidade em recrutar leucócitos para os pulmões. No entanto, além de utilizarmos protocolo de inibição na síntese desses mediadores lipídicos, como previamente descrito por Peres e colaboradores, também confirmamos os dados através da infecção de animais 5-LO KO. É importante ressaltar que as diferenças observadas na produção de IFN- γ e nitrito foram mais evidentes no protocolo em que foram utilizados os animais 5-LO KO em relação aos animais tratados com MK-886 (Figuras 15 e 16). Entretanto, Bafica e colaboradores (189) mostraram que animais 5-LO KO infectados com *M. tuberculosis* eram mais resistentes à infecção em relação aos WT. Os autores atribuem a resistência dos animais 5-LO KO à redução na síntese de lipoxinas (LX), mediadores lipídicos também derivados do metabolismo do ácido araquidônico pela 5-LO, caracterizados, entretanto, por suas propriedades antiinflamatórias (248, 249). Estes autores mostraram que animais WT infectados produziram concentrações maiores de LXA₄ em relação aos animais 5-LO KO infectados, que apresentaram alta expressão de RNAm para IFN- γ , IL-12 e óxido nítrico sintase (189). A discrepância entre os nossos dados e aqueles de Peres e colaboradores comparados aos resultados descritos por Bafica e colaboradores pode ser relacionada às diferenças no modelo experimental, representadas tanto pela via de contato com os bacilos (intratraqueal X aerossol) como no número de bacilos administrados (1×10^5 UFC X 3×10^2 UFC ou ainda 50 bacilos). O número de bacilos usado para promover a infecção experimental está relacionado com a região (entenda-se localização geográfica) onde a infecção é realizada. Já está descrito que nos países em desenvolvimento, existe a necessidade de se utilizar um número elevado de bacilos para promover infecção experimental, enquanto nos países desenvolvidos, o tamanho do inóculo é bem menor (50-100 bacilos) (250).

Em continuidade à nossa proposta de estudo, observamos que a imunização de animais 5-LO KO com ambas as preparações vacinais, seguindo-se o desafio com os bacilos, resultou em maior recuperação dos mesmos em pulmão comparando-se aos respectivos

grupos WT imunizados e desafiados (Figura 5A). Devido à maior suscetibilidade natural dos animais 5-LO KO à tuberculose experimental, a eficácia protetora das vacinas empregando o esquema *prime-boost* nesses animais foi reduzida, em relação aos WT, embora eles ainda estivessem significativamente protegidos quando comparados aos animais 5-LO KO não imunizados. O mesmo não aconteceu com o esquema de imunização homóloga de animais 5-LO KO com DNA-HSP65, cuja proteção foi completamente abolida (Figuras 5A e 5B). O BCG, empregado como primeira imunização (*prime*) da estratégia *prime-boost*, é uma vacina viva e atenuada, e constituída por diferentes antígenos. Possivelmente, ele representa um bom imunógeno que possibilita a indução de mediadores inflamatórios, diferenciação e expansão de um número considerável de clones antígeno-específicos. Resultados menos evidentes relacionados ao papel dos LT na proteção conferida por ambos os esquemas de imunização foram obtidos com a inibição farmacológica da síntese de LT através do tratamento de animais com MK-886 (Figura 5C). O fato da eficácia protetora do esquema *prime-boost* ou da imunização homóloga com DNA-HSP65 ter sido maior nos grupos tratados com MK-886 em relação aos grupos imunizados não tratados, pode ser decorrente do fato do tratamento não bloquear totalmente a síntese de LT.

Medeiros e colaboradores já haviam descrito que LT estavam relacionados com proteção na infecção por *Histoplasma capsulatum* (132). Posteriormente, estes autores também mostraram que o efeito protetor conferido pela imunização com antígenos de *H. capsulatum* era totalmente abolido em animais 5-LO KO. Animais 5-LO KO imunizados produziam baixas concentrações de nitrito e IFN- γ , e secretaram altas concentrações de TGF- β e IL-10 (133). Como a resposta imune que confere proteção contra a infecção por *H. capsulatum* é similar à resposta imune que também confere proteção contra *M. tuberculosis*, estes dados de Medeiros e colaboradores representavam mais um indício de que a ausência de LT endógenos afeta negativamente a resposta protetora conferida pelo esquema de imunização. Comparando esses dados aos nossos, também relacionados com a eficácia protetora de duas preparações vacinais (imunização homóloga e heteróloga), vemos que a efetuação da resposta imune protetora induzida pelas imunizações ocorreu, mas foi prejudicada, tornando animais 5-LO KO imunizados mais suscetíveis à infecção em relação aos WT.

Quando nós caracterizamos o influxo de células, a produção de citocinas e de nitrito nos animais, verificamos que os animais 5-LO KO infectados, previamente imunizados ou não, produziam concentrações bastante inferiores de IFN- γ (cerca de 10 vezes menores em

relação aos animais WT) e nitrito, além de recrutarem número significativamente menor de células CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ e CD11c⁺.

O papel protetor do IFN- γ já está classicamente descrito na tuberculose humana (92) e experimental (78, 79). Aliás, o IFN- γ permanece ainda como o melhor marcador relacionado com proteção na tuberculose, embora a busca e a caracterização de outros marcadores associados com proteção ou que possam prever a infecção ou a progressão da mesma, sejam importantes para melhor definir o perfil da resposta imune dos indivíduos com infecção latente ou ativa, contribuindo talvez para o diagnóstico dessa patologia (251-253). Com relação ao papel do óxido nítrico na infecção experimental, este intermediário reativo do nitrogênio contribui para o controle da infecção, uma vez que animais deficientes para a síntese da enzima óxido nítrico sintase são mais suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis* (241). Em humanos, ainda não há um consenso com relação ao papel do NO na proteção contra infecção (254, 255). A diminuição na secreção de nitrito observada em animais 5-LO KO infectados pode estar relacionada com o já descrito papel do LTB₄ em estimular a secreção deste mediador microbicida por macrófagos alveolares (171). Assim, era de se esperar que houvesse diminuição na secreção de nitrito em animais 5-LO KO, vacinados ou não e infectados (Figura 15). Desse modo, assim como na infecção por *H. capsulatum*, os LT parecem desempenhar papel indireto na proteção contra infecção por *M. tuberculosis*, uma vez que a ausência desses mediadores gerou produção deficiente de IFN- γ e NO, além da incapacidade em recrutar leucócitos (Figura 12), contribuindo para agravar a suscetibilidade dos animais.

Também observamos que animais 5-LO KO infectados secretaram concentrações significativamente menores de IL-17 em relação aos animais WT (Figura 16E), um dado original, ainda não descrito na literatura. Uma exceção foi observada nos pulmões de animais 5-LO KO vacinados pela estratégia *prime-boost*, que secretaram mais IL-17 que os animais 5-LO KO não imunizados. Isso pode ser interessante porque mesmo tendo sido capazes de controlar o crescimento de bacilos (comparando aos 5-LO KO não imunizados), os animais imunizados pela estratégia *prime-boost* secretaram concentrações diminutas de IFN- γ e nitrito. Portanto, a IL-17 pode desempenhar um papel importante na proteção observada. Além disso, animais 5-LO KO imunizados com DNA-HSP65 não foram protegidos e apresentaram baixas concentrações de IFN- γ , IL-17 e nitrito nos pulmões. Aliás, o diferencial quando se compara os grupos de animais 5-LO KO vacinados pela estratégia *prime-boost* ou DNA-HSP65, foi a produção de IL-17. Estes dados sugerem que a imunização de animais 5-LO KO pelo esquema *prime-boost* induziu a diferenciação de células Th17 e tais dados

apontam para o possível papel da IL-17 na proteção contra tuberculose. Alguns trabalhos de nosso grupo indicam que a IL-17 deve exercer papel protetor nesta doença. Oliveira e Paula e colaboradores mostraram que o menor número de bacilos encontrado em animais C57BL/6 na fase tardia da infecção está relacionado com maior capacidade em recrutar linfócitos para o pulmão, além da detecção de concentrações mais elevadas de IFN- γ e IL-17 em relação àquelas detectadas em pulmão de animais BALB/c (102). Em estudo que avalia a eficácia protetora conferida por esquema de imunização heteróloga resultante de primeira imunização com BCG (*prime*) seguida de segunda imunização com proteínas de filtrado de cultura de *M. tuberculosis* acrescidas de motivos CpG (*boost*), nós mostramos que tanto a produção de IFN- γ e IL-17 na presença de uma resposta de padrão Th2 (IL-4) bem regulada, ou seja, em baixas concentrações, estão associadas ao melhor controle da infecção por animais vacinados comparados àqueles não imunizados ou àqueles que receberam imunização com dose única de BCG (256). Nosso grupo ainda mostrou que a estimulação de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis ou de pacientes com tuberculose recém-diagnosticados (virgens de tratamento) com a vacina DNA-HSP65 estimulou aumento na frequência de células CD4⁺ e células CD8⁺ produtoras de IL-17 (238).

A função da IL-17 vem sendo bastante investigada em diversas infecções (257-260). Na tuberculose, a indução de células Th17 durante o processo de imunização com um peptídeo derivado da proteína ESAT-6 e adjuvantes, parece ser importante para induzir indiretamente o recrutamento de células de padrão Th1 via produção de quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 para o pulmão de animais imunizados e desafiados (261). Além destes, outros trabalhos também têm demonstrado a importância da IL-17 na imunidade protetora contra tuberculose (262, 263). A IL-17 também apresenta o potencial de induzir o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas (264). Um intenso recrutamento desses leucócitos polimorfonucleares estimula inflamação exacerbada, que além de ser prejudicial para o hospedeiro, não necessariamente contribui para o controle da infecção. No entanto, através da análise histopatológica, não constatamos aumento no influxo de neutrófilos nos grupos de animais nos quais foi detectado aumento na secreção de IL-17 (WT não imunizados e infectados e 5-LO KO imunizados pelo esquema *prime-boost*) (Figuras 9A e 9D).

Um dado intrigante foi termos detectado produção de LTB₄ em pulmões de animais 5-LO KO. Acreditamos que isso possa estar relacionado com, por exemplo, a reatividade cruzada entre o LTB₄ e outros intermediários originados do metabolismo do ácido araquidônico. Bafica e colaboradores também detectaram altas concentrações de LTB₄ em

pulmões de animais 5-LO KO infectados com *M. tuberculosis* (189). Da mesma forma, Medeiros e colaboradores encontraram concentrações detectáveis de LTB₄ nos pulmões de animais 5-LO KO infectados com *H. capsulatum* (133).

A modulação negativa na produção de citocinas e, provavelmente de quimiocinas, pode resultar também em desequilíbrio na síntese de outros mediadores lipídicos, como as PG. De fato, nós encontramos aumento significativo na produção de PGE₂ no pulmão de animais 5-LO KO imunizados ou não, e posteriormente, infectados. O potencial anti-inflamatório da PGE₂ é bem descrito. Sabe-se que este mediador pode inibir a fagocitose de macrófagos (121) e secreção de quimiocinas (122), estimular a secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, e inibir a de pró-inflamatórias, como IL-12 (123), além de inibir a atividade de células NK e linfócitos T (124, 125). Na tuberculose, foi demonstrado que as PG desempenham um papel negativo na resposta imune contra a doença, contribuindo no seu agravamento (181-183). As PG podem participar também na diferenciação e expansão de células Treg. Foi demonstrado que Treg de indivíduos saudáveis que apresentaram reação positiva para tuberculina proliferaram *in vitro* quando co-cultivados com monócitos e ManLam de *M. tuberculosis*. A adição de NS398 (inibidor de COX-2) inibiu significativamente a expansão das Treg, indicando que a PGE₂ contribuiu na expansão destas células (129). Além disso, monócitos humanos estimulados com LPS foram capazes de suprimir a proliferação de células mononucleares por um mecanismo dependente da secreção de PGE₂ e diferenciação de células T reguladoras induzidas (130). As altas concentrações de PGE₂ detectadas nos pulmões de animais 5-LO KO podem estar relacionadas com maior diferenciação/expansão de Treg. Na tuberculose, a maioria das evidências clínicas e experimentais mostra que as células Treg suprimem a produção de IFN- γ por células CD4⁺ efectoras, sendo tal fato relacionado com a progressão da infecção (65, 66, 70-72, 102).

Em nosso estudo, embora o recrutamento de células CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ e CD11c⁺ tenha sido drasticamente reduzido para os pulmões de animais 5-LO KO infectados, nós encontramos aumento no influxo de células Foxp3⁺ no local da infecção. Este resultado sugere que a migração de células Foxp3⁺ para os pulmões de animais 5-LO KO (ou de animais tratados com MK-886) durante a infecção não depende da presença de LT endógenos ou até mesmo de outros mediadores quimiotáticos estimulados por eles. Entretanto, a imunização de animais 5-LO KO com a estratégia *prime-boost* (a qual protegeu parcialmente estes animais contra desafio com *M. tuberculosis* comparando-se aos WT imunizados) resultou em diminuição no número de células Foxp3⁺ nos pulmões em relação aos animais 5-LO KO não imunizados, sendo o número encontrado similar àquele detectado em animais WT imunizados e desafiados (Figura 22I). Estes resultados sugerem que a imunização prévia

com a estratégia *prime-boost* de animais 5-LO KO infectados contribuiu para a redução na expansão do número de células Treg que possivelmente se diferenciaram durante a imunização e/ou infecção com os bacilos. Em outras palavras, animais 5-LO KO não imunizados e infectados apresentaram elevado número de células Treg nos pulmões, e a imunização com o esquema *prime-boost* fez com que tal número fosse reduzido. Esta observação, juntamente com o fato de que animais 5-LO KO infectados (imunizados ou não) secretaram maiores concentrações de PGE₂ em relação aos WT, nos levou à hipótese de que um microambiente rico em PGE₂, como aquele encontrado nos animais 5-LO KO, poderia influenciar o potencial protetor da estratégia de imunização pelo *prime-boost*, devido à indução de células Treg durante a imunização. Para testar essa hipótese, nós usamos duas estratégias. Inicialmente, nós purificamos células Treg (CD4⁺CD25⁺) do baço de animais WT ou 5-LO KO previamente imunizados e realizamos transferência dessas células para animais WT *naive*, que foram infectados simultaneamente. Apesar de não encontrarmos diferença no número de células Treg (CD4⁺CD25⁺) purificadas de animais WT ou 5-LO KO imunizados (Figura 20A), dado que sugeria que o processo de imunização não estava induzindo células Treg, nós ainda consideramos a possibilidade de que as células Treg purificadas de animais WT ou 5-LO KO pudessem apresentar capacidade supressora distinta. Entretanto, a transferência de células Treg de animais 5-LO KO imunizados não tornou os animais infectados mais suscetíveis à infecção.

A outra estratégia que usamos foi o bloqueio da produção endógena de PG através do tratamento com o composto celecoxib durante todo o período em que os animais foram imunizados (45 dias). A escolha de ter feito o bloqueio de PG durante a imunização (e não durante a infecção) reside no fato de que considerávamos o processo de imunização um evento de grande importância na ativação e diferenciação de células de memória, as quais atuam na efetuação da resposta protetora da vacina. A capacidade protetora da imunização de animais WT pelo esquema *prime-boost* foi abolida quando esses animais foram tratados com celecoxib durante a imunização e, posteriormente desafiados, uma vez que o número de bacilos nos pulmões não foi diferente estatisticamente daquele encontrado em animais WT não imunizados e tratados (Figura 21A). Efeito semelhante foi visto nos grupos de animais 5-LO KO, ou seja, animais 5-LO KO imunizados pelo esquema *prime-boost* e tratados com celecoxib tiveram maior número de bacilos em relação aos animais 5-LO KO imunizados e não tratados, ou seja, a capacidade protetora induzida pela vacina foi perdida. Assim, de modo contrário à nossa hipótese, parece que também a presença de PG durante o processo de imunização deve ser importante para a proteção conferida pela estratégia *prime-boost*. É importante ressaltar novamente que a PG parece não desempenhar função na expansão ou

diferenciação de células Treg durante o processo de imunização, pois não houve aumento no número de células Foxp3⁺ após a imunização de animais 5-LO KO. Assim, nossos resultados indicam que a maior diferenciação de células Treg (Foxp3⁺) encontrada nos animais 5-LO KO deve ocorrer somente após o contato com *M. tuberculosis*, ou seja, durante o período de infecção e possa ser dependente do aumento na síntese de PG por esses animais. Provavelmente, a elevada produção de PG e, conseqüentemente, alta frequência de células Treg são mecanismos que podem estar envolvidos no aumento da suscetibilidade desses animais não imunizados e infectados, refletindo a baixa secreção de IFN- γ e produção de nitrito. Em contrapartida, a imunização prévia dos animais 5-LO KO através da estratégia *prime-boost* pode gerar um microambiente favorável para a diferenciação de células efetoras do tipo Th1 e Th17 (ao invés de células Treg), e quando estes animais entrarem em contato com o bacilo, esse perfil de resposta pode contribuir na inibição da expansão de células Treg. Isso pode explicar o fato dos animais 5-LO KO imunizados e desafiados apresentarem menos células Treg nos pulmões em relação aos animais 5-LO KO não imunizados e infectados (Figura 22I).

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que os LT podem representar fator de suscetibilidade adicional à tuberculose, uma vez que animais C57BL/6, cuja capacidade em restringir a infecção é maior que a de animais BALB/c, secretaram mais LT comparados aos BALB/c. Além disso, os animais C57BL/6 tornaram-se suscetíveis quando a síntese de LT foi bloqueada. Assim na ausência de LT (5-LO KO) ou em microambiente onde ocorre baixa síntese desses mediadores (tratamento com MK-886), ocorre aumento da suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis*. Tal suscetibilidade está associada com baixa secreção de IFN- γ , nitrito e IL-17, além da incapacidade do hospedeiro em recrutar leucócitos para o local da infecção. Os resultados que são originais em nosso estudo são aqueles que demonstram que o aumento na suscetibilidade parece ser dependente do aumento na produção de PG, que por sua vez pode contribuir para aumentar a frequência de células Treg no pulmão de animais 5-LO KO infectados. Entretanto, a ausência de LT elimina parcialmente a proteção induzida pela imunização heteróloga e totalmente a proteção induzida pela vacina DNA-HSP65. No primeiro caso, a imunização parece induzir células Th17 e impede aumento na frequência de células Treg, como observado em animais 5-LO KO imunizados e infectados. Provavelmente, esse tipo de resposta imune está contribuindo para a proteção parcial da vacina heteróloga em animais 5-LO KO.

6. Conclusões

- 1) Nossos resultados confirmam que os leucotrienos (LT) contribuem para controlar a infecção por *M. tuberculosis* e sugerem que a deficiência na síntese desses mediadores está associada com aumento da suscetibilidade à tuberculose experimental – (evidência experimental: animais C57BL/6 secretaram maiores concentrações de LTB₄ e quando tratados com MK-886, tornaram-se suscetíveis à infecção);
- 2) Os LT exercem importante função na ativação da resposta imune protetora contra tuberculose – (evidência experimental: a ausência de LT (5-LO KO) ou em microambiente onde ocorre baixa síntese desses mediadores (tratamento com MK-886), resultou em baixa secreção de IFN- γ , nitrito e IL-17, alta secreção de PGE₂, defeito no recrutamento de leucócitos e maior influxo de células T reguladoras para o local da infecção);
- 3) Os LT são importantes para a efetuação da resposta protetora contra a tuberculose conferida por imunização heteróloga (BCG/DNA-HSP65) ou homóloga (DNA-HSP65) – (evidência experimental: a ausência de LT eliminou parcial (imunização BCG/DNA-HSP65) ou completamente (imunização DNA-HSP65) a proteção conferida pelas vacinas);
- 4) A proteção parcial conferida pela imunização heteróloga de animais 5-LO KO parece estar associada com a secreção de IL-17 e menor influxo de células Foxp3⁺ para os pulmões.
- 5) As PG presentes no momento da imunização podem ter papel importante no desenvolvimento de uma resposta imune protetora gerada pela imunização heteróloga. A inibição da síntese de PG durante a imunização reduziu o efeito protetor tanto em animais WT quanto 5-LO KO – (evidência experimental: animais WT ou 5-LO KO tratados com celecoxib durante a imunização heteróloga foram mais suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis*).

7. Bibliografia

1. WHO. 2008. Global Tuberculosis Control. *World Health Organization Geneva*.
2. Hernandez, C., A. S. Cetner, J. E. Jordan, S. N. Puangsuvan, and J. K. Robinson. 2008. Tuberculosis in the age of biologic therapy. *J Am Acad Dermatol* 59:363-380; quiz 382-364.
3. North, R. J., and Y. J. Jung. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 22:599-623.
4. Camus, J. C., M. J. Pryor, C. Medigue, and S. T. Cole. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148:2967-2973.
5. Andersen, P. 2001. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol* 22:160-168.
6. von Reyn, C. F., and J. M. Vuola. 2002. New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 35:465-474.
7. Bodnar, K. A., N. V. Serbina, and J. L. Flynn. 2001. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infect Immun* 69:800-809.
8. Ulrichs, T., and S. H. Kaufmann. 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 208:261-269.
9. Ernst, J. D. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66:1277-1281.
10. Tailleux, L., B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. [DC-SIGN, a key receptor of *Mycobacterium tuberculosis*?]. *Med Sci (Paris)* 19:658-660.
11. Tailleux, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197:121-127.
12. Armstrong, J. A., and P. D. Hart. 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 142:1-16.
13. Le Cabec, V., C. Cols, and I. Maridonneau-Parini. 2000. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun* 68:4736-4745.
14. Russell, D. G. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol* 5:39-47.
15. den Dunnen, J., S. I. Gringhuis, and T. B. Geijtenbeek. 2008. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother*.
16. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-680.
17. Quesniaux, V., C. Fremond, M. Jacobs, S. Parida, D. Nicolle, V. Yermeev, F. Bihl, F. Erard, T. Botha, M. Drennan, M. N. Soler, M. Le Bert, B. Schnyder, and B. Ryffel. 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 6:946-959.
18. Li, Q., and I. M. Verma. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-734.
19. Stenger, S., and R. L. Modlin. 2002. Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 14:452-457.
20. Pompei, L., S. Jang, B. Zamylyny, S. Ravikumar, A. McBride, S. P. Hickman, and P. Salgame. 2007. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol* 178:5192-5199.
21. Scanga, C. A., A. Bafica, C. G. Feng, A. W. Cheever, S. Hieny, and A. Sher. 2004. MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun* 72:2400-2404.

22. Fremond, C. M., V. Yeremeev, D. M. Nicolle, M. Jacobs, V. F. Quesniaux, and B. Ryffel. 2004. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest* 114:1790-1799.
23. Bafica, A., C. A. Scanga, C. G. Feng, C. Leifer, A. Cheever, and A. Sher. 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 202:1715-1724.
24. Yang, Y., C. Yin, A. Pandey, D. Abbott, C. Sasseti, and M. A. Kelliher. 2007. NOD2 pathway activation by MDP or *Mycobacterium tuberculosis* infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. *J Biol Chem* 282:36223-36229.
25. Korb, D. S., B. E. Schneider, and U. E. Schaible. 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect* 10:995-1004.
26. Gandotra, S., S. Jang, P. J. Murray, P. Salgame, and S. Ehrt. 2007. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 75:5127-5134.
27. Divangahi, M., S. Mostowy, F. Coulombe, R. Kozak, L. Guillot, F. Veyrier, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, P. Gros, and M. A. Behr. 2008. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. *J Immunol* 181:7157-7165.
28. Austin, C. M., X. Ma, and E. A. Graviss. 2008. Common nonsynonymous polymorphisms in the NOD2 gene are associated with resistance or susceptibility to tuberculosis disease in African Americans. *J Infect Dis* 197:1713-1716.
29. Saunders, B. M., and A. M. Cooper. 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 78:334-341.
30. Liu, P. T., and R. L. Modlin. 2008. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* 20:371-376.
31. Franco, L. H., P. F. Wowk, C. L. Silva, A. P. Trombone, A. A. Coelho-Castelo, C. Oliver, M. C. Jamur, E. L. Moretto, and V. L. Bonato. 2008. A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells. *Genet Vaccines Ther* 6:3.
32. Hanekom, W. A., M. Mendillo, C. Manca, P. A. Haslett, M. R. Siddiqui, C. Barry, 3rd, and G. Kaplan. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *J Infect Dis* 188:257-266.
33. Henderson, R. A., S. C. Watkins, and J. L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 159:635-643.
34. Heldwein, K. A., and M. J. Fenton. 2002. The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes Infect* 4:937-944.
35. Orme, I. M., E. S. Miller, A. D. Roberts, S. K. Furney, J. P. Griffin, K. M. Dobos, D. Chi, B. Rivoire, and P. J. Brennan. 1992. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol* 148:189-196.
36. Hopewell, P. C. 1992. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management, and control of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 15:540-547.
37. Caruso, A. M., N. Serbina, E. Klein, K. Triebold, B. R. Bloom, and J. L. Flynn. 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis. *J Immunol* 162:5407-5416.
38. Repique, C. J., A. Li, W. J. Brickey, J. P. Ting, F. M. Collins, and S. L. Morris. 2003. Susceptibility of mice deficient in the MHC class II transactivator to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 58:15-22.

39. Behar, S. M., C. C. Dascher, M. J. Grusby, C. R. Wang, and M. B. Brenner. 1999. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189:1973-1980.
40. Cooper, A. M., J. Magram, J. Ferrante, and I. M. Orme. 1997. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186:39-45.
41. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, K. J. Triebold, B. Koller, and B. R. Bloom. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12013-12017.
42. Sousa, A. O., R. J. Mazzaccaro, R. G. Russell, F. K. Lee, O. C. Turner, S. Hong, L. Van Kaer, and B. R. Bloom. 2000. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4204-4208.
43. van Pinxteren, L. A., J. P. Cassidy, B. H. Smedegaard, E. M. Agger, and P. Andersen. 2000. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol* 30:3689-3698.
44. Serbina, N. V., C. C. Liu, C. A. Scanga, and J. L. Flynn. 2000. CD8+ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *J Immunol* 165:353-363.
45. Silva, C. L., V. L. Bonato, K. M. Lima, A. A. Coelho-Castelo, L. H. Faccioli, A. Sartori, A. O. De Souza, and S. C. Leao. 2001. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 197:11-18.
46. Stenger, S., and R. L. Modlin. 1998. Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* 10:471-477.
47. Lewinsohn, D. M., M. R. Alderson, A. L. Briden, S. R. Riddell, S. G. Reed, and K. H. Grabstein. 1998. Characterization of human CD8+ T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen-presenting cells. *J Exp Med* 187:1633-1640.
48. Schaible, U. E., F. Winau, P. A. Sieling, K. Fischer, H. L. Collins, K. Hagens, R. L. Modlin, V. Brinkmann, and S. H. Kaufmann. 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 9:1039-1046.
49. Winau, F., S. Weber, S. Sad, J. de Diego, S. L. Hoops, B. Breiden, K. Sandhoff, V. Brinkmann, S. H. Kaufmann, and U. E. Schaible. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24:105-117.
50. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626-1629.
51. Ehlers, S. 1999. Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. *FEMS Immunol Med Microbiol* 23:149-158.
52. Saunders, B. M., and W. J. Britton. 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 85:103-111.
53. Egen, J. G., A. G. Rothfuchs, C. G. Feng, N. Winter, A. Sher, and R. N. Germain. 2008. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity* 28:271-284.
54. Davis, J. M., and L. Ramakrishnan. 2008. "The very pulse of the machine": the tuberculous granuloma in motion. *Immunity* 28:146-148.
55. Ulrichs, T., G. A. Kosmiadi, V. Trusov, S. Jorg, L. Pradl, M. Titukhina, V. Mishenko, N. Gushina, and S. H. Kaufmann. 2004. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 204:217-228.
56. Fenhalls, G., A. Wong, J. Bezuidenhout, P. van Helden, P. Bardin, and P. T. Lukey. 2000. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infect Immun* 68:2827-2836.

57. Johnson, C. M., A. M. Cooper, A. A. Frank, C. B. Bonorino, L. J. Wysoki, and I. M. Orme. 1997. Mycobacterium tuberculosis aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. *Tuber Lung Dis* 78:257-261.
58. Turner, J., A. A. Frank, J. V. Brooks, M. Gonzalez-Juarrero, and I. M. Orme. 2001. The progression of chronic tuberculosis in the mouse does not require the participation of B lymphocytes or interleukin-4. *Exp Gerontol* 36:537-545.
59. Randhawa, P. S. 1990. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology* 22:153-155.
60. Bosio, C. M., D. Gardner, and K. L. Elkins. 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* 164:6417-6425.
61. Carlos, D., D. A. de Souza Junior, L. de Paula, M. C. Jamur, C. Oliver, S. G. Ramos, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2007. Mast cells modulate pulmonary acute inflammation and host defense in a murine model of tuberculosis. *J Infect Dis* 196:1361-1368.
62. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
63. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329-341.
64. Kursar, M., M. Koch, H. W. Mittrucker, G. Nouailles, K. Bonhagen, T. Kamradt, and S. H. Kaufmann. 2007. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 178:2661-2665.
65. Guyot-Revol, V., J. A. Innes, S. Hackforth, T. Hinks, and A. Lalvani. 2006. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 173:803-810.
66. Ribeiro-Rodrigues, R., T. Resende Co, R. Rojas, Z. Toossi, R. Dietze, W. H. Boom, E. Maciel, and C. S. Hirsch. 2006. A role for CD4⁺CD25⁺ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 144:25-34.
67. Chen, X., B. Zhou, M. Li, Q. Deng, X. Wu, X. Le, C. Wu, N. Larmonier, W. Zhang, H. Zhang, H. Wang, and E. Katsanis. 2007. CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾FoxP3⁽⁺⁾ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* 123:50-59.
68. Hougardy, J. M., V. Verscheure, C. Locht, and F. Mascarot. 2007. In vitro expansion of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low/-} regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy Mycobacterium tuberculosis-infected humans. *Microbes Infect* 9:1325-1332.
69. Li, L., and C. Y. Wu. 2008. CD4⁺ CD25⁺ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M tuberculosis antigen ESAT-6. *Blood* 111:5629-5636.
70. Quinn, K. M., R. S. McHugh, F. J. Rich, L. M. Goldsack, G. W. de Lisle, B. M. Buddle, B. Delahunt, and J. R. Kirman. 2006. Inactivation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells during early mycobacterial infection increases cytokine production but does not affect pathogen load. *Immunol Cell Biol* 84:467-474.
71. Scott-Browne, J. P., S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan, and K. B. Urdahl. 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med* 204:2159-2169.
72. Mason, C. M., E. Porretta, P. Zhang, and S. Nelson. 2007. CD4⁺ CD25⁺ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. *Clin Exp Immunol* 148:537-545.
73. Harrington, L. E., P. R. Mangan, and C. T. Weaver. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 18:349-356.
74. Louten, J., K. Boniface, and R. de Waal Malefyt. 2009. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 123:1004-1011.

75. Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S. I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot, and V. Soumelis. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 9:650-657.
76. Cruz, A., S. A. Khader, E. Torrado, A. Fraga, J. E. Pearl, J. Pedrosa, A. M. Cooper, and A. G. Castro. 2006. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol* 177:1416-1420.
77. Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M. D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, T. Suda, K. Sudo, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 178:3786-3796.
78. Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178:2243-2247.
79. Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, and B. R. Bloom. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 178:2249-2254.
80. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2:561-572.
81. North, R. J. 1998. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 113:55-58.
82. Berrington, W. R., and T. R. Hawn. 2007. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 219:167-186.
83. Ding, A. H., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-2412.
84. Flesch, I. E., J. H. Hess, I. P. Oswald, and S. H. Kaufmann. 1994. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN-gamma stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-alpha and by IL-10. *Int Immunol* 6:693-700.
85. Pearl, J. E., B. Saunders, S. Ehlers, I. M. Orme, and A. M. Cooper. 2001. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. *Cell Immunol* 211:43-50.
86. Fonseca, D. M., C. L. Silva, M. O. Paula, E. G. Soares, G. Marchal, C. Horn, and V. L. Bonato. 2007. Increased levels of interferon-gamma primed by culture filtrate proteins antigen and CpG-ODN immunization do not confer significant protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 121:508-517.
87. Gutierrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, and V. Deretic. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119:753-766.
88. Singh, S. B., A. S. Davis, G. A. Taylor, and V. Deretic. 2006. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313:1438-1441.
89. Axelrod, S., H. Oschkinat, J. Enders, B. Schlegel, V. Brinkmann, S. H. Kaufmann, A. Haas, and U. E. Schaible. 2008. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell Microbiol* 10:1530-1545.
90. Bean, A. G., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 162:3504-3511.
91. Dorman, S. E., and S. M. Holland. 2000. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:321-333.

92. Jouanguy, E., F. Altare, S. Lamhamedi, P. Revy, J. F. Emile, M. Newport, M. Levin, S. Blanche, E. Seboun, A. Fischer, and J. L. Casanova. 1996. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med* 335:1956-1961.
93. Newport, M. J., C. M. Huxley, S. Huston, C. M. Hawrylowicz, B. A. Oostra, R. Williamson, and M. Levin. 1996. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 335:1941-1949.
94. Vlachaki, E., K. Psathakis, K. Tsintiris, and A. Iliopoulos. 2005. Delayed response to anti-tuberculosis treatment in a patient on infliximab. *Respir Med* 99:648-652.
95. Hernandez-Pando, R., D. Aguilar, M. L. Hernandez, H. Orozco, and G. Rook. 2004. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis. *Eur J Immunol* 34:174-183.
96. Seah, G. T., and G. A. Rook. 2001. IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF-alpha. *J Immunol* 167:1230-1237.
97. van Crevel, R., E. Karyadi, F. Preyers, M. Leenders, B. J. Kullberg, R. H. Nelwan, and J. W. van der Meer. 2000. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis* 181:1194-1197.
98. Erb, K. J., J. Kirman, B. Delahunt, W. Chen, and G. Le Gros. 1998. IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of M. bovis-BCG infection in mice. *Immunol Cell Biol* 76:41-46.
99. Jung, Y. J., L. Ryan, R. LaCourse, and R. J. North. 2003. Increased interleukin-10 expression is not responsible for failure of T helper 1 immunity to resolve airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Immunology* 109:295-299.
100. Sheil, B., J. MacSharry, L. O'Callaghan, A. O'Riordan, A. Waters, J. Morgan, J. K. Collins, L. O'Mahony, and F. Shanahan. 2006. Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. *Clin Exp Immunol* 144:273-280.
101. Turner, J., M. Gonzalez-Juarrero, D. L. Ellis, R. J. Basaraba, A. Kipnis, I. M. Orme, and A. M. Cooper. 2002. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol* 169:6343-6351.
102. Oliveira e Paula, M., D. M. Fonseca, P. F. Wowk, A. F. Gembre, C. L. Silva, and V. L. Bonato. 2009. Regulatory T cells may represent a susceptibility factor in experimental tuberculosis. *Artigo submetido*.
103. Mumm, J. B., S. Ekmekcioglu, N. J. Poindexter, S. Chada, and E. A. Grimm. 2006. Soluble human MDA-7/IL-24: characterization of the molecular form(s) inhibiting tumor growth and stimulating monocytes. *J Interferon Cytokine Res* 26:877-886.
104. Wu, B., C. Huang, L. Garcia, A. Ponce de Leon, J. S. Osornio, M. Bobadilla-del-Valle, L. Ferreira, S. Canizales, P. Small, M. Kato-Maeda, A. M. Krensky, and C. Clayberger. 2007. Unique gene expression profiles in infants vaccinated with different strains of Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin. *Infect Immun* 75:3658-3664.
105. Huang, D., L. Qiu, R. Wang, X. Lai, G. Du, P. Seghal, Y. Shen, L. Shao, L. Halliday, J. Fortman, L. Shen, N. L. Letvin, and Z. W. Chen. 2007. Immune gene networks of mycobacterial vaccine-elicited cellular responses and immunity. *J Infect Dis* 195:55-69.
106. Wu, B., C. Huang, M. Kato-Maeda, P. C. Hopewell, C. L. Daley, A. M. Krensky, and C. Clayberger. 2007. Messenger RNA expression of IL-8, FOXP3, and IL-12beta differentiates latent tuberculosis infection from disease. *J Immunol* 178:3688-3694.
107. Wu, B., C. Huang, M. Kato-Maeda, P. C. Hopewell, C. L. Daley, A. M. Krensky, and C. Clayberger. 2008. IL-24 modulates IFN-gamma expression in patients with tuberculosis. *Immunol Lett* 117:57-62.
108. Chen, Q., N. Ghilardi, H. Wang, T. Baker, M. H. Xie, A. Gurney, I. S. Grewal, and F. J. de Sauvage. 2000. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407:916-920.

109. Kamiya, S., T. Owaki, N. Morishima, F. Fukai, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto. 2004. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 173:3871-3877.
110. Holscher, C., A. Holscher, D. Ruckerl, T. Yoshimoto, H. Yoshida, T. Mak, C. Saris, and S. Ehlers. 2005. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol* 174:3534-3544.
111. Flamand, N., P. Mancuso, C. H. Serezani, and T. G. Brock. 2007. Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. *Cell Mol Life Sci* 64:2657-2670.
112. Petasis, N. A., I. Akritopoulou-Zanze, V. V. Fokin, G. Bernasconi, R. Keledjian, R. Yang, J. Uddin, K. C. Nagulapalli, and C. N. Serhan. 2005. Design, synthesis and bioactions of novel stable mimetics of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:301-321.
113. Rocca, B., and G. A. FitzGerald. 2002. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol* 2:603-630.
114. Bozza, P. T., K. G. Magalhaes, and P. F. Weller. 2009. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1791:540-551.
115. Herschman, H. R. 1996. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1299:125-140.
116. Otto, J. C., and W. L. Smith. 1995. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:139-156.
117. Vane, J. R., Y. S. Bakhle, and R. M. Botting. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120.
118. Harris, S. G., J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23:144-150.
119. Smith, W. L., and R. Langenbach. 2001. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 107:1491-1495.
120. Breyer, R. M., C. K. Bagdassarian, S. A. Myers, and M. D. Breyer. 2001. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:661-690.
121. Aronoff, D. M., C. Canetti, and M. Peters-Golden. 2004. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 173:559-565.
122. Takayama, K., G. Garcia-Cardena, G. K. Sukhova, J. Comander, M. A. Gimbrone, Jr., and P. Libby. 2002. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* 277:44147-44154.
123. Harizi, H., M. Juzan, V. Pitard, J. F. Moreau, and N. Gualde. 2002. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol* 168:2255-2263.
124. Linnemeyer, P. A., and S. B. Pollack. 1993. Prostaglandin E2-induced changes in the phenotype, morphology, and lytic activity of IL-2-activated natural killer cells. *J Immunol* 150:3747-3754.
125. Nataraj, C., D. W. Thomas, S. L. Tilley, M. T. Nguyen, R. Mannon, B. H. Koller, and T. M. Coffman. 2001. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 108:1229-1235.
126. Katamura, K., N. Shintaku, Y. Yamauchi, T. Fukui, Y. Ohshima, M. Mayumi, and K. Furusho. 1995. Prostaglandin E2 at priming of naive CD4⁺ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J Immunol* 155:4604-4612.
127. Chizzolini, C., R. Chicheportiche, M. Alvarez, C. de Rham, P. Roux-Lombard, S. Ferrari-Lacraz, and J. M. Dayer. 2008. Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood* 112:3696-3703.

128. Baratelli, F., Y. Lin, L. Zhu, S. C. Yang, N. Heuze-Vourc'h, G. Zeng, K. Reckamp, M. Dohadwala, S. Sharma, and S. M. Dubinett. 2005. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol* 175:1483-1490.
129. Garg, A., P. F. Barnes, S. Roy, M. F. Quiroga, S. Wu, V. E. Garcia, S. R. Krutzik, S. E. Weis, and R. Vankayalapati. 2008. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol* 38:459-469.
130. Bryn, T., S. Yaqub, M. Mahic, K. Henjum, E. M. Aandahl, and K. Tasken. 2008. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3+ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism. *Int Immunol* 20:235-245.
131. Sharma, S., S. C. Yang, L. Zhu, K. Reckamp, B. Gardner, F. Baratelli, M. Huang, R. K. Batra, and S. M. Dubinett. 2005. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 65:5211-5220.
132. Medeiros, A. I., A. Sa-Nunes, E. G. Soares, C. M. Peres, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2004. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 72:1637-1644.
133. Medeiros, A. I., A. Sa-Nunes, W. M. Turato, A. Secatto, F. G. Frantz, C. A. Sorgi, C. H. Serezani, G. S. Deepe, Jr., and L. H. Faccioli. 2008. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *J Immunol* 181:8544-8551.
134. Medeiros, A. I., C. L. Silva, A. Malheiro, C. M. Maffei, and L. H. Faccioli. 1999. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live Histoplasma capsulatum or by the beta-glucan present in their cell wall. *Br J Pharmacol* 128:1529-1537.
135. Brock, T. G., R. Paine, 3rd, and M. Peters-Golden. 1994. Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* 269:22059-22066.
136. Luo, M., S. M. Jones, M. Peters-Golden, and T. G. Brock. 2003. Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12165-12170.
137. Woods, J. W., M. J. Coffey, T. G. Brock, Singer, II, and M. Peters-Golden. 1995. 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J Clin Invest* 95:2035-2046.
138. Needleman, P., J. Turk, B. A. Jakschik, A. R. Morrison, and J. B. Lefkowitz. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 55:69-102.
139. Lewis, R. A., and K. F. Austen. 1984. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J Clin Invest* 73:889-897.
140. Radmark, O. P. 2000. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *Am J Respir Crit Care Med* 161:S11-15.
141. Koeberle, A., U. Siemoneit, H. Northoff, B. Hofmann, G. Schneider, and O. Werz. 2009. MK-886, an inhibitor of the 5-lipoxygenase-activating protein, inhibits cyclooxygenase-1 activity and suppresses platelet aggregation. *Eur J Pharmacol*.
142. Anderson, K. M., T. Seed, J. M. Plate, A. Jajeh, J. Meng, and J. E. Harris. 1995. Selective inhibitors of 5-lipoxygenase reduce CML blast cell proliferation and induce limited differentiation and apoptosis. *Leuk Res* 19:789-801.
143. Ghosh, J., and C. E. Myers. 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13182-13187.
144. Funk, C. D., and X. S. Chen. 2000. 5-Lipoxygenase and leukotrienes. Transgenic mouse and nuclear targeting studies. *Am J Respir Crit Care Med* 161:S120-124.
145. DiMeo, D., J. Tian, J. Zhang, S. Narushima, and D. J. Berg. 2008. Increased interleukin-10 production and Th2 skewing in the absence of 5-lipoxygenase. *Immunology* 123:250-262.
146. Kanaoka, Y., and J. A. Boyce. 2004. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol* 173:1503-1510.

147. Tager, A. M., and A. D. Luster. 2003. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:123-134.
148. Crooks, S. W., and R. A. Stockley. 1998. Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol* 30:173-178.
149. Goldman, D. W., L. A. Gifford, T. Marotti, C. H. Koo, and E. J. Goetzel. 1987. Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B4. *Fed Proc* 46:200-203.
150. Yokomizo, T., T. Izumi, K. Chang, Y. Takuwa, and T. Shimizu. 1997. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 387:620-624.
151. Devchand, P. R., H. Keller, J. M. Peters, M. Vazquez, F. J. Gonzalez, and W. Wahli. 1996. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384:39-43.
152. Luster, A. D., and A. M. Tager. 2004. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat Rev Immunol* 4:711-724.
153. Payan, D. G., A. Missirlian-Bastian, and E. J. Goetzel. 1984. Human T-lymphocyte subset specificity of the regulatory effects of leukotriene B4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3501-3505.
154. Tager, A. M., S. K. Bromley, B. D. Medoff, S. A. Islam, S. D. Bercury, E. B. Friedrich, A. D. Carafone, R. E. Gerszten, and A. D. Luster. 2003. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol* 4:982-990.
155. Garcia-Marcos, L., and A. Schuster. 1999. New perspectives for asthma treatment: anti-leukotriene drugs. *Pediatr Allergy Immunol* 10:77-88.
156. Ford-Hutchinson, A. W., M. A. Bray, M. V. Doig, M. E. Shipley, and M. J. Smith. 1980. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-265.
157. Shin, E. H., H. Y. Lee, and Y. S. Bae. 2006. Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* 348:606-611.
158. Smith, M. J., A. W. Ford-Hutchinson, and M. A. Bray. 1980. Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J Pharm Pharmacol* 32:517-518.
159. Dahlen, S. E., J. Bjork, P. Hedqvist, K. E. Arfors, S. Hammarstrom, J. A. Lindgren, and B. Samuelsson. 1981. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3887-3891.
160. Tonnesen, M. G. 1989. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol* 93:53S-58S.
161. van Pelt, J. P., E. M. de Jong, P. E. van Erp, M. I. Mitchell, P. Marder, S. M. Spaethe, C. A. van Hooijdonk, A. L. Kuijpers, and P. C. van de Kerkhof. 1997. The regulation of CD11b integrin levels on human blood leukocytes and leukotriene B4-stimulated skin by a specific leukotriene B4 receptor antagonist (LY293111). *Biochem Pharmacol* 53:1005-1012.
162. Vaddi, K., and R. C. Newton. 1994. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 153:4721-4732.
163. Del Prete, A., W. H. Shao, S. Mitola, G. Santoro, S. Sozzani, and B. Haribabu. 2007. Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function. *Blood* 109:626-631.
164. Parameswaran, K., H. Liang, A. Fanat, R. Watson, D. P. Snider, and P. M. O'Byrne. 2004. Role for cysteinyl leukotrienes in allergen-induced change in circulating dendritic cell number in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114:73-79.
165. Robbiani, D. F., R. A. Finch, D. Jager, W. A. Muller, A. C. Sartorelli, and G. J. Randolph. 2000. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103:757-768.

166. Sumimoto, H., K. Takeshige, and S. Minakami. 1984. Superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by leukotriene B₄. *Biochim Biophys Acta* 803:271-277.
167. Flamand, L., M. J. Tremblay, and P. Borgeat. 2007. Leukotriene B₄ triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents. *J Immunol* 178:8036-8045.
168. Rae, S. A., and M. J. Smith. 1981. The stimulation of lysosomal enzyme secretion from human polymorphonuclear leucocytes by leukotriene B₄. *J Pharm Pharmacol* 33:616-617.
169. Mancuso, P., P. Nana-Sinkam, and M. Peters-Golden. 2001. Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 69:2011-2016.
170. Demitsu, T., H. Katayama, T. Saito-Taki, H. Yaoita, and M. Nakano. 1989. Phagocytosis and bactericidal action of mouse peritoneal macrophages treated with leukotriene B₄. *Int J Immunopharmacol* 11:801-808.
171. Serezani, C. H., J. H. Perrela, M. Russo, M. Peters-Golden, and S. Jancar. 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 177:3201-3208.
172. Marcinkiewicz, J., A. Grabowska, K. Bryniarski, and B. M. Chain. 1997. Enhancement of CD4⁺ T-cell-dependent interleukin-2 production in vitro by murine alveolar macrophages: the role of leukotriene B₄. *Immunology* 91:369-374.
173. Stankova, J., N. Gagnon, and M. Rola-Pleszczynski. 1992. Leukotriene B₄ augments interleukin-2 receptor-beta (IL-2R beta) expression and IL-2R beta-mediated cytotoxic response in human peripheral blood lymphocytes. *Immunology* 76:258-263.
174. Arcoleo, F., S. Milano, P. D'Agostino, and E. Cillari. 1995. Effect of exogenous leukotriene B₄ (LTB₄) on BALB/c mice splenocyte production of Th1 and Th2 lymphokines. *Int J Immunopharmacol* 17:457-463.
175. Yamaoka, K. A., and J. P. Kolb. 1993. Leukotriene B₄ induces interleukin 5 generation from human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 23:2392-2398.
176. Rola-Pleszczynski, M., L. Gagnon, and P. Sirois. 1983. Leukotriene B₄ augments human natural cytotoxic cell activity. *Biochem Biophys Res Commun* 113:531-537.
177. Gaudreault, E., and J. Gosselin. 2008. Leukotriene B₄ induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. *J Immunol* 180:6211-6221.
178. Coffey, M. J., S. M. Phare, S. George, M. Peters-Golden, and P. H. Kazanjian. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils. *J Clin Invest* 102:663-670.
179. Krarup, E., J. Vestbo, T. L. Benfield, and J. D. Lundgren. 1997. Interleukin-8 and leukotriene B₄ in bronchoalveolar lavage fluid from HIV-infected patients with bacterial pneumonia. *Respir Med* 91:317-321.
180. Bailie, M. B., T. J. Standiford, L. L. Laichalk, M. J. Coffey, R. Strieter, and M. Peters-Golden. 1996. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* 157:5221-5224.
181. Edwards, C. K., 3rd, H. B. Hedegaard, A. Zlotnik, P. R. Gangadharam, R. B. Johnston, Jr., and M. J. Pabst. 1986. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E₂ and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-gamma. *J Immunol* 136:1820-1827.
182. Rangel Moreno, J., I. Estrada Garcia, M. De La Luz Garcia Hernandez, D. Aguilar Leon, R. Marquez, and R. Hernandez Pando. 2002. The role of prostaglandin E₂ in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 106:257-266.
183. Hernandez-Pando, R., H. Orozco-Esteves, H. A. Maldonado, D. Aguilar-Leon, M. M. Vilchis-Landeros, D. A. Mata-Espinosa, V. Mendoza, and F. Lopez-Casillas. 2006. A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 144:264-272.

184. Peres, C. M. 2004. Participação de prostaglandinas e leucotrienos na tuberculose experimental. *Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP*:91p.
185. D'Avila, H., N. R. Roque, R. M. Cardoso, H. C. Castro-Faria-Neto, R. C. Melo, and P. T. Bozza. 2008. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol* 10:2589-2604.
186. Almeida, P. E., A. R. Silva, C. M. Maya-Monteiro, D. Torocsik, H. D'Avila, B. Dezso, K. G. Magalhaes, H. C. Castro-Faria-Neto, L. Nagy, and P. T. Bozza. 2009. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol* 183:1337-1345.
187. el-Ahmady, O., M. Mansour, H. Zoeir, and O. Mansour. 1997. Elevated concentrations of interleukins and leukotriene in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Ann Clin Biochem* 34 (Pt 2):160-164.
188. Peres, C. M., L. de Paula, A. I. Medeiros, C. A. Sorgi, E. G. Soares, D. Carlos, M. Peters-Golden, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2007. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 9:483-489.
189. Bafica, A., C. A. Scanga, C. Serhan, F. Machado, S. White, A. Sher, and J. Aliberti. 2005. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest* 115:1601-1606.
190. Grange, J. M., J. Gibson, T. W. Osborn, C. H. Collins, and M. D. Yates. 1983. What is BCG? *Tubercle* 64:129-139.
191. O'Donnell, M. A. 1997. The genetic reconstruction of BCG as a new immunotherapeutic tool. *Trends Biotechnol* 15:512-517.
192. Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Burdick, H. V. Fineberg, and F. Mosteller. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *Jama* 271:698-702.
193. Murphy, D., L. A. Corner, and E. Gormley. 2008. Adverse reactions to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination against tuberculosis in humans, veterinary animals and wildlife species. *Tuberculosis (Edinb)* 88:344-357.
194. McShane, H., A. A. Pathan, C. R. Sander, N. P. Goonetilleke, H. A. Fletcher, and A. V. Hill. 2005. Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis (Edinb)* 85:47-52.
195. Skeiky, Y. A., M. R. Alderson, P. J. Ovendale, J. A. Guderian, L. Brandt, D. C. Dillon, A. Campos-Neto, Y. Lobet, W. Dalemans, I. M. Orme, and S. G. Reed. 2004. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* 172:7618-7628.
196. Weinrich Olsen, A., L. A. van Pinxteren, L. Meng Okkels, P. Birk Rasmussen, and P. Andersen. 2001. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect Immun* 69:2773-2778.
197. Reece, S. T., and S. H. Kaufmann. 2008. Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. *Int J Med Microbiol* 298:143-150.
198. Horwitz, M. A., G. Harth, B. J. Dillon, and S. Maslesa-Galic. 2000. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13853-13858.
199. Grode, L., P. Seiler, S. Baumann, J. Hess, V. Brinkmann, A. Nasser Eddine, P. Mann, C. Goosmann, S. Bandermann, D. Smith, G. J. Bancroft, J. M. Reyrat, D. van Soolingen, B. Raupach, and S. H. Kaufmann. 2005. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest* 115:2472-2479.

200. Gurunathan, S., D. M. Klinman, and R. A. Seder. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* 18:927-974.
201. Kutzler, M. A., and D. B. Weiner. 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9:776-788.
202. Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P. L. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-1468.
203. Tang, D. C., M. DeVit, and S. A. Johnston. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-154.
204. Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, and et al. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745-1749.
205. MacGregor, R. R., J. D. Boyer, K. E. Ugen, K. E. Lacy, S. J. Gluckman, M. L. Bagarazzi, M. A. Chattergoon, Y. Baine, T. J. Higgins, R. B. Ciccarelli, L. R. Coney, R. S. Ginsberg, and D. B. Weiner. 1998. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 178:92-100.
206. Le, T. P., K. M. Coonan, R. C. Hedstrom, Y. Charoenvit, M. Sedegah, J. E. Epstein, S. Kumar, R. Wang, D. L. Doolan, J. D. Maguire, S. E. Parker, P. Hobart, J. Norman, and S. L. Hoffman. 2000. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine* 18:1893-1901.
207. Liu, M. A., and J. B. Ulmer. 2005. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet* 55:25-40.
208. Mincheff, M., S. Tchakarov, S. Zoubak, D. Loukinov, C. Botev, I. Altankova, G. Georgiev, S. Petrov, and H. T. Meryman. 2000. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol* 38:208-217.
209. Tacket, C. O., M. J. Roy, G. Widera, W. F. Swain, S. Broome, and R. Edelman. 1999. Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 17:2826-2829.
210. Ulmer, J. B., B. Wahren, and M. A. Liu. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med* 12:216-222.
211. Davidson, A. H., J. L. Traub-Dargatz, R. M. Rodeheaver, E. N. Ostlund, D. D. Pedersen, R. G. Moorhead, J. B. Stricklin, R. D. Dewell, S. D. Roach, R. E. Long, S. J. Albers, R. J. Callan, and M. D. Salman. 2005. Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J Am Vet Med Assoc* 226:240-245.
212. Garver, K. A., S. E. LaPatra, and G. Kurath. 2005. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHNV) virus DNA vaccine in Chinook Oncorhynchus tshawytscha and sockeye O. nerka salmon. *Dis Aquat Organ* 64:13-22.
213. Thacker, E. L., D. J. Holtkamp, A. S. Khan, P. A. Brown, and R. Draghia-Akli. 2006. Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with Mycoplasma hyopneumoniae and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Anim Sci* 84:733-742.
214. Lechardeur, D., A. S. Verkman, and G. L. Lukacs. 2005. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 57:755-767.
215. Rock, K. L., and L. Shen. 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207:166-183.
216. Bonato, V. L., V. M. Lima, R. E. Tascon, D. B. Lowrie, and C. L. Silva. 1998. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun* 66:169-175.

217. Lowrie, D. B., R. E. Tascon, V. L. Bonato, V. M. Lima, L. H. Faccioli, E. Stavropoulos, M. J. Colston, R. G. Hewinson, K. Moelling, and C. L. Silva. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400:269-271.
218. Silva, C. L., V. L. Bonato, V. M. Lima, L. H. Faccioli, and S. C. Leao. 1999. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. *Immunology* 97:573-581.
219. Bonato, V. L., E. D. Goncalves, E. G. Soares, R. R. Santos Junior, A. Sartori, A. A. Coelho-Castelo, and C. L. Silva. 2004. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology* 113:130-138.
220. Zarate-Blades, C. R., V. L. Bonato, E. L. da Silveira, M. Oliveira e Paula, C. M. Junta, P. Sandrin-Garcia, A. L. Fachin, S. S. Mello, R. S. Cardoso, F. C. Galetti, A. A. Coelho-Castelo, S. G. Ramos, E. A. Donadi, E. T. Sakamoto-Hojo, G. A. Passos, and C. L. Silva. 2009. Comprehensive gene expression profiling in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* following DNAhsp65 immunotherapy. *J Gene Med* 11:66-78.
221. Pelizon, A. C., D. R. Martins, S. F. Zorzella, A. P. Trombone, J. C. Lorenzi, R. F. Carvalho, I. T. Brandao, A. A. Coelho-Castelo, C. L. Silva, and A. Sartori. 2007. Genetic vaccine for tuberculosis (pVAXhsp65) primes neonate mice for a strong immune response at the adult stage. *Genet Vaccines Ther* 5:12.
222. Coelho-Castelo, A. A., A. P. Trombone, R. S. Rosada, R. R. Santos, Jr., V. L. Bonato, A. Sartori, and C. L. Silva. 2006. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genet Vaccines Ther* 4:1.
223. Afek, A., J. George, B. Gilburd, L. Rauova, I. Goldberg, J. Kopolovic, D. Harats, and Y. Shoenfeld. 2000. Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. *J Autoimmun* 14:115-121.
224. Bras, A., and A. P. Aguas. 1996. Diabetes-prone NOD mice are resistant to *Mycobacterium avium* and the infection prevents autoimmune disease. *Immunology* 89:20-25.
225. Keren, P., J. George, A. Shaish, H. Levkovitz, Z. Janakovic, A. Afek, I. Goldberg, J. Kopolovic, G. Keren, and D. Harats. 2000. Effect of hyperglycemia and hyperlipidemia on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice: establishment of a combined model and association with heat shock protein 65 immunity. *Diabetes* 49:1064-1069.
226. Santos Junior, R. R., A. Sartori, V. L. Bonato, A. A. Coelho Castelo, C. A. Vilella, R. L. Zollner, and C. L. Silva. 2007. Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression. *Clin Exp Immunol* 149:570-578.
227. Santos-Junior, R. R., A. Sartori, M. De Franco, O. G. Filho, A. A. Coelho-Castelo, V. L. Bonato, W. H. Cabrera, O. M. Ibanez, and C. L. Silva. 2005. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. *Hum Gene Ther* 16:1338-1345.
228. Fonseca, D. M., V. L. Bonato, C. L. Silva, and A. Sartori. 2007. Th1 polarized response induced by intramuscular DNA-HSP65 immunization is preserved in experimental atherosclerosis. *Braz J Med Biol Res* 40:1495-1504.
229. Changhong, S., Z. Hai, W. Limei, A. Jiaze, X. Li, Z. Tingfen, X. Zhikai, and Z. Yong. 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)* 89:54-61.
230. de Paula, L., C. L. Silva, D. Carlos, C. Matias-Peres, C. A. Sorgi, E. G. Soares, P. R. Souza, C. R. Blades, F. C. Galleti, V. L. Bonato, E. D. Goncalves, E. V. Silva, and L. H. Faccioli. 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.
231. Rosada, R. S., L. G. de la Torre, F. G. Frantz, A. P. Trombone, C. R. Zarate-Blades, D. M. Fonseca, P. R. Souza, I. T. Brandao, A. P. Masson, E. G. Soares, S. G. Ramos, L. H. Faccioli, C. L. Silva, M. H.

- Santana, and A. A. Coelho-Castelo. 2008. Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. *BMC Immunol* 9:38.
232. Goncalves, E. D., V. L. Bonato, D. M. da Fonseca, E. G. Soares, I. T. Brandao, A. P. Soares, and C. L. Silva. 2007. Improve protective efficacy of a TB DNA-HSP65 vaccine by BCG priming. *Genet Vaccines Ther* 5:7.
233. Castelli, C., L. Rivoltini, F. Rini, F. Belli, A. Testori, M. Maio, V. Mazzaferro, J. Coppa, P. K. Srivastava, and G. Parmiani. 2004. Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. *Cancer Immunol Immunother* 53:227-233.
234. Prohaszka, Z. 2007. Chaperones as part of immune networks. *Adv Exp Med Biol* 594:159-166.
235. Lukacs, K. V., D. B. Lowrie, R. W. Stokes, and M. J. Colston. 1993. Tumor cells transfected with a bacterial heat-shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. *J Exp Med* 178:343-348.
236. Yi, H., Y. Rong, Z. Yankai, L. Wentao, Z. Hongxia, W. Jie, C. Rongyue, L. Taiming, and L. Jingjing. 2006. Improved efficacy of DNA vaccination against breast cancer by boosting with the repeat beta-hCG C-terminal peptide carried by mycobacterial heat-shock protein HSP65. *Vaccine* 24:2575-2584.
237. Michaluart, P., K. A. Abdallah, F. D. Lima, R. Smith, R. A. Moyses, V. Coelho, G. D. Victora, A. Socorro-Silva, E. C. Volsi, C. R. Zarate-Blades, A. R. Ferraz, A. K. Barreto, M. C. Chammas, R. Gomes, E. Gebrim, L. Arakawa-Sugueno, K. P. Fernandes, P. A. Lotufo, M. R. Cardoso, J. Kalil, and C. L. Silva. 2008. Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Gene Ther* 15:676-684.
238. Wowk, P. F., L. H. Franco, O. A. Martins-Filho, M. Palaci, D. M. Fonseca, M. Oliveira e Paula, E. O. Vianna, A. P. Wendling, V. M. Augusto, S. M. Elói-Santos, A. Teixeira-Carvalho, F. D. C. Silva, S. A. Vinhas, C. L. Silva, and V. L. D. Bonato. 2009. Hsp65 antigen upregulates the cellular immune response of healthy individuals compared to tuberculosis patients. *Artigo submetido*.
239. McDonough, K. A., and Y. Kress. 1995. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63:4802-4811.
240. Pradelles, P., J. Grassi, and J. MacLouf. 1985. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem* 57:1170-1173.
241. MacMicking, J. D., R. J. North, R. LaCourse, J. S. Mudgett, S. K. Shah, and C. F. Nathan. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5243-5248.
242. Medina, E., and R. J. North. 1996. Evidence inconsistent with a role for the Bcg gene (Nramp1) in resistance of mice to infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 183:1045-1051.
243. Medina, E., and R. J. North. 1999. Genetically susceptible mice remain proportionally more susceptible to tuberculosis after vaccination. *Immunology* 96:16-21.
244. North, R. J., L. Ryan, R. LaCourse, T. Mogues, and M. E. Goodrich. 1999. Growth rate of mycobacteria in mice as an unreliable indicator of mycobacterial virulence. *Infect Immun* 67:5483-5485.
245. Yoshida, A., Y. Koide, M. Uchijima, and T. O. Yoshida. 1995. Dissection of strain difference in acquired protective immunity against *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin bacillus (BCG). Macrophages regulate the susceptibility through cytokine network and the induction of nitric oxide synthase. *J Immunol* 155:2057-2066.
246. Wakeham, J., J. Wang, and Z. Xing. 2000. Genetically determined disparate innate and adaptive cell-mediated immune responses to pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun* 68:6946-6953.
247. Peters-Golden, M., C. Canetti, P. Mancuso, and M. J. Coffey. 2005. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 174:589-594.

248. Aliberti, J. 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol* 5:162-170.
249. Machado, F. S., and J. Aliberti. 2006. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. *Immunol Res* 35:209-218.
250. Rook, G. A., K. Dheda, and A. Zumla. 2005. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol* 5:661-667.
251. Hovav, A. H., Y. Fishman, and H. Bercovier. 2005. Gamma interferon and monophosphoryl lipid A-trehalose dicorynomycolate are efficient adjuvants for *Mycobacterium tuberculosis* multivalent acellular vaccine. *Infect Immun* 73:250-257.
252. Jamil, B., F. Shahid, Z. Hasan, N. Nasir, T. Razzaki, G. Dawood, and R. Hussain. 2007. Interferon gamma/IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 87:279-287.
253. Sahiratmadja, E., B. Alisjahbana, S. Buccheri, D. Di Liberto, T. de Boer, I. Adnan, R. van Crevel, M. R. Klein, K. E. van Meijgaarden, R. H. Nelwan, E. van de Vosse, F. Dieli, and T. H. Ottenhoff. 2007. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. *Tuberculosis (Edinb)* 87:312-321.
254. Rockett, K. A., R. Brookes, I. Udalova, V. Vidal, A. V. Hill, and D. Kwiatkowski. 1998. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun* 66:5314-5321.
255. Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291:1544-1547.
256. Fonseca, D. M., C. L. Silva, P. F. Wowk, M. Oliveira e Paula, S. G. Ramos, C. Horn, G. Marchal, and V. L. D. Bonato. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins plus CpG-ODN confer protection to BCG primed mice by inducing IFN-gama, IL-17 and inhibiting IL-4 secretion. *Manuscripto submetido*.
257. Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639-646.
258. Aujla, S. J., Y. R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D. J. Askew, D. A. Pociask, T. A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, S. Husain, J. L. Kreindler, P. J. Dubin, J. M. Pilewski, M. M. Myerburg, C. A. Mason, Y. Iwakura, and J. K. Kolls. 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14:275-281.
259. Higgins, S. C., A. G. Jarnicki, E. C. Lavelle, and K. H. Mills. 2006. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 177:7980-7989.
260. Wu, Q., R. J. Martin, J. G. Rino, R. Breed, R. M. Torres, and H. W. Chu. 2007. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect* 9:78-86.
261. Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall, and A. M. Cooper. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8:369-377.
262. Happel, K. I., E. A. Lockhart, C. M. Mason, E. Porretta, E. Keoshkerian, A. R. Odden, S. Nelson, and A. J. Ramsay. 2005. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs. *Infect Immun* 73:5782-5788.

263. Wozniak, T. M., A. A. Ryan, and W. J. Britton. 2006. Interleukin-23 restores immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-12p40-deficient mice and is not required for the development of IL-17-secreting T cell responses. *J Immunol* 177:8684-8692.
264. Linden, A., M. Laan, and G. P. Anderson. 2005. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J* 25:159-172.

8. Artigo para submissão

Impaired protection conferred by immunization with BCG prime/DNA-HSP65 boost against tuberculosis in the absence of leukotrienes is associated to imbalance of PGE₂ production and increased Foxp3⁺ cells

Luís Henrique Franco¹, Marina Oliveira e Paula¹, Pryscilla Fanini Wowk¹, Denise Moraes da Fonseca¹, Cássia Alves Sérgio¹, Paola Fernanda Fedatto¹, Ana Flávia Gembre¹, Carlos A. Sorgi², Simone Gusmão Ramos³, Célio Lopes Silva¹, Alexandra Ivo de Medeiros⁴, Lúcia Helena Faccioli² and Vânia Luiza Deperon Bonato¹

ABSTRACT

LTB₄ is described as a powerful leukotropic and proinflammatory mediator. It has been shown that LTB₄ is involved in host defense in a variety of infectious diseases. In the *Mycobacterium tuberculosis* infection, the role of leukotrienes (LT) is not clearly understood. In this study, we use 5-lipoxygenase deficient mice (5-LO^{-/-}) to evaluate whether leukotrienes are involved in the protective immune response generated by heterologous immunization with BCG prime – DNA-HSP65 boost against tuberculosis. We showed that 5-LO^{-/-} mice were more susceptible to infection than wild type (WT) mice. Infected 5-LO^{-/-} mice secreted lesser concentrations of IFN- γ , nitrite and IL-17, and higher concentration of PGE₂ than infected WT mice. Impaired cell influx and high number of Foxp3⁺ cells was found in the lungs of infected 5-LO^{-/-} mice. Prime-boost immunized 5-LO^{-/-} mice were partially protected after *M. tuberculosis* challenge compared to prime-boost immunized, challenged WT mice. An increase in IL-17 secretion and a decrease in the number of Foxp3⁺ cells was observed in the lungs of prime-boost immunized, challenged 5-LO^{-/-} mice compared to non-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice. These results suggest that IL-17 is associated with partial protection conferred by prime-boost immunization in 5-LO^{-/-} mice. Moreover, our data support that the deficiency in the synthesis of LT favor PGE₂ secretion which may contribute for Foxp3⁺ cells expansion. Overall, our results reinforce the key role of LT in immune response against tuberculosis, suggesting that they act through the induction of soluble mediator involved in protection against infection, such as IFN- γ , nitrite and IL-17, and inhibiting T regulatory cells differentiation.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is the second leading cause of death from an infectious disease, following HIV-1 infection. Two million people die from TB each year while one-third of the world's population is latently infected with *Mycobacterium tuberculosis* (1). Despite BCG have been the vaccine most used in history (2), its protective efficacy in adult against pulmonary forms of TB is variable (3, 4). The rational design for development of TB vaccines or immunotherapy is based on the comprehension of the mechanisms involved in the regulation of immune response in this infection.

The major mechanism of cellular immune response against TB is the IFN- γ -producing CD4 Th1-cell which mediates activation of macrophages to destroy intracellular bacterial pathogens (5-8). Numerous studies have indicated that cytotoxic CD8 T cell-mediated killing of infected host cells and cytotoxic CD8 T cells producing IFN- γ do play a role in the defense against *M. tuberculosis* (9-12). Besides to IFN- γ and cytokines such as IL-12 and TNF- α (13, 14), lipid mediators such as leukotrienes (LT) are

involved in the control of host defense against *M. tuberculosis* infection (15). On the opposite, regulatory T (Treg) cells have been related to the TB immunopathology. An increase in the frequency of circulating Treg cells associated to Treg-induced IFN- γ suppression has been described in TB (16-20).

Experimental data collected by our group over the last years have shown that DNA-HSP65 vaccine, a recombinant plasmid whereas *M. leprae* 65-kDa heat shock gene was inserted, conferred protection to immunized mice and also to already infected, DNA-HSP65-treated mice (21-24). In an attempting to optimize the protective effect of this DNA vaccine, we have tested a prime-boost heterologous vaccination by using intranasal BCG priming / intramuscular DNA-HSP65 boosting. We found that this strategy provided significantly greater protection than that afforded by a single BCG dose (25).

Because LT are powerful leukotropic and proinflammatory mediators (26-28) and moreover, LTB₄ is involved in host defense in a variety of infectious diseases (15, 29-31), including micobacterial infections (15), we hypothesize that LT might be important mediators involved in the protective immune

response generated by heterologous immunization with BCG prime – DNA-HSP65 boost against TB. To test this hypothesis we immunized mice deficient for the expression of 5-lipoxygenase (5-LO^{-/-}) with BCG subcutaneous prime followed by DNA-HSP65 intramuscular boost (BCG prime-DNA-HSP65 boost) and then challenged them with *M. tuberculosis*. We confirmed that LT contribute to the protective immune response against TB and they also participate on the protective efficacy induced by prime-boost immunization in *M. tuberculosis*-challenged mice. In addition, our data support that the deficiency of LT synthesis seems to favor PGE₂-induced Treg cell expansion which probably contributes for increasing susceptibility to infection.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female 6-8-wk-old 5-LO^{-/-} (129-Alox5tm I Fun) and strain-matched wild type (WT) were obtained from Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Brazil). Mice were housed under barrier conditions in a level III biohazard laboratory and provided with food and sterile water. Experiments were conducted according to the local ethical guidelines.

Bacteria

The *M. tuberculosis* H37Rv strain (n° 27294; ATCC, Rockville, MD, USA) was grown in an incubator for 7 days at 37°C in 7H9 Middlebrook broth (Difco, USA) enriched with 0.2% (v/v) glycerol and 10% (v/v) OADC (Difco, USA) and was prepared as described (21).

Plasmid construction

The DNA vaccine pVAX-HSP65 (DNA-HSP65) was derived from the pVAX vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and was constructed as described (32). Endotoxin concentration was measured using the Limulus amoebocyte lysate kit – QCL-1000 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). Endotoxin amounts for plasmid used in this study were ≤ 0.1 endotoxin units/μg of DNA.

Immunization and challenge infection

For homologous DNA vaccination, mice were injected with a single 50-μg dose of DNA-HSP65 in 50 μL of saline plus 50% sucrose into each quadriceps muscle 3 times in a 15 day-intervals by using insulin syringe with an ultra-fine II short needle (Becton and Dickson, Franklin Lakes, NJ – USA). For heterologous vaccination, received 10⁵ *M. bovis* BCG (Moreau strain) (Fundação Ataulpho Paiva – FAP, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) in 100 μL of PBS/mouse (prime) and 15 days after, mice received 50 μg of DNA-HSP65 in 50 μL of saline plus 50% sucrose into each quadriceps muscle (boost). Thirty days after last immunization, mice

were challenged through injection of bacterial solution (1 × 10⁵ *M. tuberculosis*/animal) by intratracheal route according to harmonization procedures of animals.

Colony Forming Units (CFU) assay

The right lower and middle lobes of lungs were digested using Liberase Blendzyme 2 solution, 0.5 μg/mL (Roche, Indianapolis, IN) and DNase, 25 U/mL (Sigma), as previously described (21). For the CFU assay, serial dilutions of digested lungs and macerated spleens were plated on 7H11 agar media (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). CFU number was counted 28 days after incubation at 37°C.

Flow cytometry

Total lung cell counts were determined in a Neubauer chamber and lung cell suspension was adjusted to 1 × 10⁵ cells/0.1 mL. FcRs were blocked by the addition of unlabeled anti-CD16/32 (clone 2.4G2) (BD Pharmingen). The frequency of specific cells was determined by staining with appropriate concentrations of fluorochrome-conjugated mAbs specific for murine CD4 PE (clone H129.19), CD8 FITC (clone 53-6.7), CD11b PE (clone M1/70) and CD11c FITC (clone HL3) (BD Pharmingen). The samples were washed and fixed in 2% paraformaldehyde. The total number of positive cells for each cell population was calculated through the following equation:

$$\text{total number} = \frac{\text{total lung cell count} \times \text{frequency of positive cells}}{100}$$

Cytokine production

The left lobes of lungs were removed and homogenized (Mixer Homogenizer, Labortechnik, Germany) in 2 ml of RPMI 1640 (Sigma), centrifuged at 1500 × g, and stored at -70 °C until assayed. IFN-γ and IL-12 concentrations were determined in supernatants by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) according to the manufacturer's instructions. The following anti-mouse purified monoclonal antibodies (mAb) were used (1 μg/ml): IFN-γ (R4-6A2); IL-12 (C15.6) (BD Biosciences – PharMingen, San Diego, CA). Cytokine-antibody complexes were detected via the addition of 0.5 μg/ml of anti-mouse biotinylated mAb: IFN-γ (XMG1.2); IL-12 (C17.8) (BD Biosciences – PharMingen, San Diego, CA). For IL-17 detection, ELISA SET R&D was used.

Measurement of PGE₂ and LTB₄

Lipids were purified from lung homogenate supernatants obtained as cited above with Sep-Pak C₁₈ cartridges according to the instructions of the manufacturer (Waters Corp., Milford, Mass.). Concentrations of PGE₂ and LTB₄ were measured using commercial ELISA kits obtained from ACE™ EIA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

Nitric oxide (NO)

NO production was assessed by measuring the amount of nitrite in lung homogenates, obtained as described above, using the Greiss reagent (33). Values were determined using a standard curve with serial dilutions of NaNO₂ (Sigma, St. Louis, MO).

Histology and Immunohistochemistry

For histopathological analysis, the right upper lobes of the lungs were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin blocks, prepared routinely, and then sectioned for light microscopy. Five-micron sections were stained with haematoxylin-eosin. All samples were analyzed by a pathologist in a double-blind assay.

For the immunohistochemistry staining, the left lobes were frozen in O.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance, CA). Immunohistochemistry was performed using the avidin-biotin-peroxidase method with rat anti-mouse Foxp3 (FJK-16s) (Ebioscience, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The lung sections were micro-photographed in 20 different areas with a final magnification of 400x, and brown-stained areas or positive cells were counted using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Treatment of mice with celecoxib

The medicament Celebra® (Laboratórios Pfizer LTDA, Guarulhos, SP, Brasil), whose active component is celecoxib, was diluted in sterile water at 0.2 mg/mL. Mice were treated daily with celecoxib (5 mg/kg/0.5 mL) by oral route (p.o.) only during immunization with prime-boost regimen, where the first and last administration was 1 h prior BCG injection and infection of animals, respectively. As control, some groups were treated with the 0.5 mL of water.

Statistical analysis

All values were expressed as mean ± standard error of the mean. Data were compared with unpaired and nonparametric *t* test (Mann-Whitney test) using PRISMA software (version 5.0, GraphPad, San Diego, CA, USA). Values of *p* < 0.05 were considered significant.

RESULTS

LT play an essential role in the protection induced by immunization against *M. tuberculosis*

To investigate the role of LT in the protection conferred by homologous DNA-HSP65 or heterologous BCG/DNA-HSP65 (prime-boost) immunization against TB, we counted CFU number in the lungs of non-immunized, infected WT or 5-LO^{-/-} mice and in immunized, *M. tuberculosis*-challenged WT or 5-LO^{-/-} mice. Figure 1A shows that non-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice had higher numbers of CFU counts compared to non-immunized, infected WT mice (*p* < 0.05).

Immunization with prime-boost strategy reduced significantly CFU numbers in lungs of *M. tuberculosis*-challenged WT and 5-LO^{-/-} mice compared to non-immunized and infected mice. However, prime-boost immunized-5-LO^{-/-} mice had significantly higher CFU number than prime-boost-immunized WT mice. Homologous immunization with DNA-HSP65 protected WT mice, but not 5-LO^{-/-} mice. Empty pVAX vector plasmid administration did not confer any protection (data not shown). Figure 1B represents the percentage of reduction in bacilli counts induced by immunization compared to non-immunized, infected mice. Prime-boost immunization of WT mice reduced 18% of lung bacilli load, while prime-boost immunization of 5-LO^{-/-} mice reduced 9.4%, indicating that the protective effect of prime-boost immunization was better in WT than in 5-LO^{-/-} group. Therefore, in the absence of endogenous LT, the protection conferred by prime-boost strategy was reduced. However, the protection of prime-boost strategy was better than that conferred by homologous DNA-HSP65 immunization either in WT or 5-LO^{-/-} group. Because of that, we choose the prime-boost strategy to investigate the mechanisms involved in the impairment of the vaccine efficacy in LT absence.

Absence of LT impaired leukocyte migration to the lungs of prime-boost immunized mice

Since LT were firstly characterized by their role in leukocyte recruitment, we next evaluated lung cellular influx. The Figure 2B shows that non-immunized, infected WT mice had intense parenchyma injury, represented by diffuse and extensive leukocyte infiltration: few neutrophils, aggregates of foamy macrophages and lymphocytes, characterizing BALT hyperplasia, comparing to non-immunized, uninfected mice (Fig. 2A). Non-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice (Fig. 2C) had visibly more preserved lung areas devoid lesser leukocyte recruitment that one observed in infected WT mice (Fig. 2B). Lungs from prime-boost-immunized WT mice (Fig. 2D) also showed minor cell recruitment than non-immunized, infected WT mice, probably a reflex of infection control. Lungs of prime-boost immunized-5-LO^{-/-} mice (Fig. 2E) exhibited lower cell influx comparing to other experimental groups. This is probably associated to absence of LT synthesis comparing to immunized WT mice and to a better control of bacterial load compared to non-immunized-5-LO^{-/-} mice.

We also characterized cellular influx by flow cytometry. The Figure 3 shows that there was a significant recruitment of CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ and CD11c⁺ cells in the lungs of non-immunized,

infected WT or 5-LO^{-/-} mice compared to their respective control groups (non-immunized, uninfected mice). However, the recruitment of CD4⁺ and CD8⁺ cells by infected 5-LO^{-/-} mice was evidently lower than that found in infected WT mice ($p < 0.05$). Prime-boost immunized-WT mice had a decreased recruitment of CD4⁺ cells compared to non-immunized WT mice ($p < 0.05$). Immunized 5-LO^{-/-} mice recruited very low numbers of CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ or CD11c⁺ cells to the lungs which were not statistically different neither from those found in non-immunized 5-LO^{-/-} mice nor those found in immunized WT mice.

Prime-boost immunized 5-LO^{-/-} mice secreted low IFN- γ , and high IL-17 and PGE₂ compared to immunized WT mice

Non-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice secreted lower concentrations of IFN- γ , IL-17 and nitrite, and higher concentration of PGE₂ compared to non-immunized, infected WT mice ($p < 0.05$) (Figure 4). IL-12 production was similar between both groups after *M. tuberculosis* infection. Prime-boost immunized-WT mice secreted higher amounts of IL-12, and lower concentrations of IFN- γ , IL-17 and nitrite compared to non-immunized, infected WT mice ($p < 0.05$). However, IFN- γ concentrations in the lungs of immunized WT mice were still high compared to those detected in immunized 5-LO^{-/-} mice, which were even lower than those found in non-immunized 5-LO^{-/-} mice ($p < 0.05$). In spite of very low IFN- γ concentrations, immunized and challenged 5-LO^{-/-} mice secreted significant amounts of IL-17 compared to non-immunized 5-LO^{-/-}, infected mice and those immunized, challenged WT mice ($p < 0.05$). Similar concentrations of LT were found in non-immunized and immunized WT mice. However, in the absence of LT, there was a significant increase in PGE₂ secretion, either in non-immunized or immunized 5-LO^{-/-} groups.

Treg cell numbers in 5-LO^{-/-} mice decreased after prime-boost immunization

Because we found that non-immunized or immunized 5-LO^{-/-} infected mice had higher amounts of PGE₂ than WT mice, and PGE₂ had been related to expansion of Treg cells (34-36), we raised the hypothesis that the high concentrations of PGE₂ found in 5-LO^{-/-} mice could favor Treg cell expansion and contribute to the impairment in the control of *M. tuberculosis* growth. We found comparable number of CD4⁺CD25⁺ cells in spleen of uninfected WT and 5-LO^{-/-} mice at thirty days after immunization (Fig. 5A). To evaluate whether there is difference in the suppressor function of Treg cells from WT or 5-LO^{-/-} mice after prime-

boost immunization, we transferred Treg cell from either immunized WT or 5-LO^{-/-} mice to non-immunized WT recipients, followed by challenge with *M. tuberculosis*. Adoptive transfer of Treg cells from either immunized WT or 5-LO^{-/-} did not increase recipient's susceptibility as we expected (data not shown), suggesting that there was no difference between Treg cell function obtained thirty days after immunization of WT or 5-LO^{-/-} mice. In this sense, this data suggest that the absence of LT during immunization schedule seems do not be relevant for the expansion or function of Treg.

To evaluate whether the differential amounts of PGE₂ of 5-LO^{-/-} mice could be interfering in the immune response generated during immunization, favoring the differentiation of Treg cells after *M. tuberculosis* challenge, we treated WT and 5-LO^{-/-} mice with celecoxib during all period of immunization and then challenged them with *M. tuberculosis*. We observed that prime-boost immunized, challenged WT mice had higher number of Foxp3⁺ cells compared to non-immunized, infected WT mice ($p < 0.05$). Non-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice had higher number of Foxp3⁺ cells than non-immunized, infected WT mice ($p < 0.05$) (Fig. 5B). However, there was a significant decrease in the number of Foxp3⁺ cells in prime-boost immunized, challenged 5-LO^{-/-} mice compared to non-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice. The treatment of WT or 5-LO^{-/-} mice with celecoxib during immunization had no effect on the number of Foxp3⁺ cells in lungs. This data suggest that PGE₂ blocking did not interfere in Treg cell expansion during prime-boost immunization.

DISCUSSION

In this study we showed that the deficiency in LT synthesis resulted in progression of *M. tuberculosis* infection. Increased number of bacilli found in 5-LO^{-/-} mice was associated to high levels of PGE₂, increased number of Foxp3⁺ cells and decreased production of NO, IFN- γ and IL-17. However, the deficiency in LT synthesis abrogated partially the protection conferred by BCG prime-DNA-HSP65 boost immunization. In the absence of LT, immunized mice down modulated IFN- γ production, however, they maintained the secretion of IL-17 and had a decreased number of Foxp3⁺ cells in the lungs, when compared to non-immunized 5-LO^{-/-} mice.

Some studies have described that the function of LT in the host defense in a variety of infectious diseases, including TB, is associated to IFN- γ secretion, nitrite production and their ability to induce leukocyte recruitment (15, 30, 37). Peres et al. described that the abrogation of LT synthesis by

treatment with MK-886 increased lung bacterial burden and decreased IFN- γ , IL-12 and nitrite secretion after *M. tuberculosis* infection. In addition, these authors showed a reduction in the influx of neutrophils and mononuclear cells to the lungs of MK-886 treated, infected mice (15). Here we confirmed the data described by Peres et al. (15). On the contrary, Bafica et al. showed that *M. tuberculosis*-infected 5-LO^{-/-} mice were lesser susceptible than WT infected mice, and the former had an increased mRNA expression for IFN- γ , IL-12 and inducible oxide nitric sintase (38). These authors attributed the better ability of 5-LO^{-/-} mice to control the infection to a decreased synthesis of lipoxin A4, a 5-LO-derived anti-inflammatory mediator (39, 40). However, Peres et al. also showed a decreased lipoxin A4 in MK-886 treated, infected BALB/c mice (15). We suppose that the discrepancy found between our results and those of Bafica et al. may be related to the different route of infection (intratracheal vs aerosol) and the inoculum size (10⁵ bacilli vs 50 or 300 bacilli), since *M. tuberculosis* infection can produce a variety of outcomes, including slowly progressive TB or chronic experimental disease according to the route of infection, inoculum size and mice strain (41-43). Beyond IFN and nitrite, we found in infected 5-LO^{-/-} mice an impaired secretion of IL-17. IL-17 has been associated with protection against TB (44-46). Our group has found that *M. tuberculosis*-infected C57BL/6 and BALB/c control differently bacilli growth at the chronic phase of infection. C57BL/6 mice which control bacilli growth better than BALB/c mice, secrete higher IL-17 and IFN- γ concentrations and have lower frequency of Treg cells compared to infected BALB/c mice (47). We suggested that the different microenvironment which is generated in infected C57BL/6 and BALB/c mice may contribute to explain the lower frequency (expansion) of Treg cells in C57BL/6 mice and its distinct ability to control infection (47). In this context and according to data described here, we suggest that low IL-17 concentrations and high number of Foxp3⁺ cells may be additional parameters besides down-modulation of IFN- γ and NO to be associated with progression of *M. tuberculosis* infection in 5-LO^{-/-} mice. Khader et al. (45) has demonstrated that immunization with a peptide derived from ESAT-6 plus adjuvant induced IL-17-producing CD4⁺ cells, which produced CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines, responsible for the recruitment of Th1 cells after challenge with *M. tuberculosis*. Moreover, we also have described that protection of *M. tuberculosis*-challenged BALB/c mice conferred by *M. tuberculosis*-culture filtrate proteins plus CpG oligodeoxynucleotides immunization seems to be

dependent on IL-17, beyond IFN- γ and a very tightly IL-4 production (48). In addition, peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals or TB patients stimulated with DNA-HSP65 secreted significant concentrations of IL-17 (49). In this sense, if IL-17 play a protective role in *M. tuberculosis* infection as described above, the partial protection conferred by prime-boost immunization in 5-LO^{-/-} mice may be dependent on IL-17, since these mice yet secreted significant concentrations of this cytokine, in spite of they have secreted very low concentrations of IFN- γ compared to non-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice. In this way, if the protection of *M. tuberculosis*-infected mice is associated to LT because they directly or indirectly stimulate IFN- γ and nitrite production, the same cannot be mentioned regarding the role of LT in Th17 cell differentiation.

Medeiros et al. also described that the protector efficacy of immunization with *Histoplasma capsulatum* antigens against histoplasmosis was abolished in 5-LO^{-/-} mice which had lower amounts of IFN- γ and nitrite, compared to their littermates WT (50). They also showed that the protection of WT mice immunized with *H. capsulatum* antigens was associated with LTB₄ production and recruitment of memory T cells into the lungs. We found that immunization of WT mice with prime-boost strategy did not increase LTB₄ in lungs. This could be explained by the period which we detected LTB₄ production: thirty days after infection. Once LTB₄ is secreted by innate immune cells, we expected to detect this mediator at early periods of infection, as detected by Medeiros et al., which measured LTB₄ production at seven days after infection (50).

The imbalance of the soluble mediators found in infected 5-LO^{-/-} mice, associated with the absence of LT, could be responsible to the high amounts of PGE₂ found in these animals in our study. The role of PGE₂ in deactivate immune system is well known (51-54). Some researchers have shown that PG may present a non-protective role in TB (55-57). Recently, PGE₂ has also been associated to the increasing of suppressor function and expansion of Treg cells (35, 36), and several works has related the differentiation and activation of Treg cells to susceptibility of TB (58-60). We showed that the progression of *M. tuberculosis* infection in 5-LO^{-/-} mice was accompanied by high number of Foxp3⁺ cells. Nevertheless, while immunized, challenged WT mice exhibited an increasing in the number of Foxp3⁺ cells compared to non-immunized, infected WT mice, the number of these regulatory cells was significantly lower in lungs of prime-boost immunized, challenged 5-LO^{-/-} mice compared to non-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice. We

supposed that PGE₂ could be involved in the Treg cell expansion. However, whether PGE₂ participates of Treg cell expansion, this is probably occurring during *M. tuberculosis* infection and not during immunization schedule, as we reported here. Moreover, both groups of infected 5-LO^{-/-} mice, immunized or not, produced significant PGE₂ concentrations, however, while infected 5-LO^{-/-} mice had high number of Foxp3⁺ cells, prime-boost-immunized, infected 5-LO^{-/-} mice had significantly smaller amount of these cells. We suggest that in immunized mice, the induction of Th17 cells contributes to dampen the expansion of Treg cells after infection.

Finally, the results presented here show a key role of LT in host defense against *M. tuberculosis* infection. In the absence of endogenous LT synthesis, high production of PGE₂ in infected mice may favor expansion of Treg cells, increasing the susceptibility to infection. The impairment of protection conferred by prime-boost immunization in these mice may be also associated with PGE₂ e Treg cells. However, it is possible that Th17 cells may play a counterbalance in the suppression of immune response, inducing protection in immunized mice.

REFERENCES

1. WHO. 2008. Global Tuberculosis Control. *World Health Organization Geneva*.
2. Daniel, T. M. 2005. Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. *Int J Tuberc Lung Dis* 9:944-945.
3. Fine, P. E. 1989. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 2:S353-359.
4. Fine, P. E. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 346:1339-1345.
5. Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178:2243-2247.
6. Dorman, S. E., and S. M. Holland. 2000. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:321-333.
7. Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, and B. R. Bloom. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 178:2249-2254.
8. Tascon, R. E., E. Stavropoulos, K. V. Lukacs, and M. J. Colston. 1998. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8⁺ T cells requires the production of gamma interferon. *Infect Immun* 66:830-834.
9. Behar, S. M., C. C. Dascher, M. J. Grusby, C. R. Wang, and M. B. Brenner. 1999. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189:1973-1980.
10. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, K. J. Triebold, B. Koller, and B. R. Bloom. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12013-12017.
11. Silva, C. L., V. L. Bonato, K. M. Lima, A. A. Coelho-Castelo, L. H. Faccioli, A. Sartori, A. O. De Souza, and S. C. Leao. 2001. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 197:11-18.
12. Silva, C. L., and D. B. Lowrie. 2000. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 68:3269-3274.
13. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2:561-572.
14. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, K. J. Triebold, J. Sypek, S. Wolf, and B. R. Bloom. 1995. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 155:2515-2524.
15. Peres, C. M., L. de Paula, A. I. Medeiros, C. A. Sorgi, E. G. Soares, D. Carlos, M. Peters-Golden, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2007. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 9:483-489.
16. Chen, X., B. Zhou, M. Li, Q. Deng, X. Wu, X. Le, C. Wu, N. Larmonier, W. Zhang, H. Zhang, H. Wang, and E. Katsanis. 2007. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* 123:50-59.
17. Guyot-Revol, V., J. A. Innes, S. Hackforth, T. Hinks, and A. Lalvani. 2006. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 173:803-810.
18. Hougardy, J. M., V. Verscheure, C. Loch, and F. Mascart. 2007. In vitro expansion of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low} regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy *Mycobacterium tuberculosis*-infected humans. *Microbes Infect* 9:1325-1332.
19. Li, L., and C. Y. Wu. 2008. CD4⁺ CD25⁺ Treg cells inhibit human memory gamma delta T cells to produce IFN-gamma in response to *M. tuberculosis* antigen ESAT-6. *Blood* 111:5629-5636.
20. Ribeiro-Rodrigues, R., T. Resende Co, R. Rojas, Z. Toossi, R. Dietze, W. H. Boom, E. Maciel, and C. S. Hirsch. 2006. A role for CD4⁺CD25⁺ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 144:25-34.
21. Bonato, V. L., E. D. Goncalves, E. G. Soares, R. R. Santos Junior, A. Sartori, A. A. Coelho-Castelo, and C. L. Silva. 2004. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8⁺ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology* 113:130-138.
22. Bonato, V. L., V. M. Lima, R. E. Tascon, D. B. Lowrie, and C. L. Silva. 1998. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 66:169-175.
23. Lowrie, D. B., R. E. Tascon, V. L. Bonato, V. M. Lima, L. H. Faccioli, E. Stavropoulos, M. J. Colston, R. G. Hewinson, K. Moelling, and C. L. Silva. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400:269-271.
24. Silva, C. L., V. L. Bonato, V. M. Lima, L. H. Faccioli, and S. C. Leao. 1999. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. *Immunology* 97:573-581.
25. Goncalves, E. D., V. L. Bonato, D. M. da Fonseca, E. G. Soares, I. T. Brandao, A. P. Soares, and C. L. Silva. 2007. Improve protective efficacy of a TB DNA-HSP65 vaccine by BCG priming. *Genet Vaccines Ther* 5:7.
26. Ford-Hutchinson, A. W., M. A. Bray, M. V. Doig, M. E. Shipley, and M. J. Smith. 1980. Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-265.

27. Marcinkiewicz, J., A. Grabowska, K. Bryniarski, and B. M. Chain. 1997. Enhancement of CD4⁺ T-cell-dependent interleukin-2 production in vitro by murine alveolar macrophages: the role of leukotriene B₄. *Immunology* 91:369-374.
28. Smith, M. J., A. W. Ford-Hutchinson, and M. A. Bray. 1980. Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J Pharm Pharmacol* 32:517-518.
29. Bailie, M. B., T. J. Standiford, L. L. Laichalk, M. J. Coffey, R. Strieter, and M. Peters-Golden. 1996. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from Klebsiella pneumonia in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* 157:5221-5224.
30. Medeiros, A. I., A. Sa-Nunes, E. G. Soares, C. M. Peres, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2004. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 72:1637-1644.
31. Peters-Golden, M., C. Canetti, P. Mancuso, and M. J. Coffey. 2005. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 174:589-594.
32. Ruberti, M., L. K. De Melo, S. A. Dos Santos, I. T. Brandao, E. G. Soares, C. L. Silva, and J. M. Junior. 2004. Prime-boost vaccination based on DNA and protein-loaded microspheres for tuberculosis prevention. *J Drug Target* 12:195-203.
33. Stuehr, D. J., and C. F. Nathan. 1989. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543-1555.
34. Baratelli, F., Y. Lin, L. Zhu, S. C. Yang, N. Heuze-Vourc'h, G. Zeng, K. Reckamp, M. Dohadwala, S. Sharma, and S. M. Dubinett. 2005. Prostaglandin E₂ induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4⁺ T cells. *J Immunol* 175:1483-1490.
35. Bryn, T., S. Yaqub, M. Mahic, K. Henjum, E. M. Aandahl, and K. Tasken. 2008. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3⁺ T cells through a COX-2-PGE₂-dependent mechanism. *Int Immunol* 20:235-245.
36. Garg, A., P. F. Barnes, S. Roy, M. F. Quiroga, S. Wu, V. E. Garcia, S. R. Krutzik, S. E. Weis, and R. Vankayalapati. 2008. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E₂-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol* 38:459-469.
37. Serezani, C. H., J. H. Perrela, M. Russo, M. Peters-Golden, and S. Jancar. 2006. Leukotrienes are essential for the control of Leishmania amazonensis infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 177:3201-3208.
38. Bafica, A., C. A. Scanga, C. Serhan, F. Machado, S. White, A. Sher, and J. Aliberti. 2005. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest* 115:1601-1606.
39. Aliberti, J. 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by Toxoplasma gondii. *Nat Rev Immunol* 5:162-170.
40. Machado, F. S., and J. Aliberti. 2006. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. *Immunol Res* 35:209-218.
41. Chackerian, A. A., and S. M. Behar. 2003. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis: lessons from inbred strains of mice. *Tuberculosis (Edinb)* 83:279-285.
42. Rook, G. A., K. Dheda, and A. Zumla. 2005. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol* 5:661-667.
43. Rook, G. A., R. Hernandez-Pando, and A. Zumla. 2009. Tuberculosis due to high-dose challenge in partially immune individuals: a problem for vaccination? *J Infect Dis* 199:613-618.
44. Happel, K. I., E. A. Lockhart, C. M. Mason, E. Porretta, E. Keoshkerian, A. R. Odden, S. Nelson, and A. J. Ramsay. 2005. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of Mycobacterium tuberculosis in the lungs. *Infect Immun* 73:5782-5788.
45. Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall, and A. M. Cooper. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 8:369-377.
46. Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M. D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, T. Suda, K. Sudo, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 178:3786-3796.
47. Oliveira e Paula, M., D. M. Fonseca, P. F. Wowk, A. F. Gembre, C. L. Silva, and V. L. Bonato. 2009. Regulatory T cells may represent a susceptibility factor in experimental tuberculosis. *Artigo submetido*.
48. Fonseca, D. M., C. L. Silva, M. O. Paula, E. G. Soares, G. Marchal, C. Horn, and V. L. Bonato. 2007. Increased levels of interferon-gamma primed by culture filtrate proteins antigen and CpG-ODN immunization do not confer significant protection against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology* 121:508-517.
49. Wowk, P. F., L. H. Franco, O. A. Martins-Filho, M. Palaci, D. M. Fonseca, M. Oliveira e Paula, E. O. Vianna, A. P. Wendling, V. M. Augusto, S. M. Elói-Santos, A. Teixeira-Carvalho, F. D. C. Silva, S. A. Vinhas, C. L. Silva, and V. L. D. Bonato. 2009. Hsp65 antigen upregulates the cellular immune response of healthy individuals compared to tuberculosis patients. *Artigo submetido*.
50. Medeiros, A. I., A. Sa-Nunes, W. M. Turato, A. Secatto, F. G. Frantz, C. A. Sorgi, C. H. Serezani, G. S. Deepe, Jr., and L. H. Faccioli. 2008. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *J Immunol* 181:8544-8551.
51. Aronoff, D. M., C. Canetti, and M. Peters-Golden. 2004. Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 173:559-565.
52. Harizi, H., M. Juzan, V. Pitard, J. F. Moreau, and N. Gualde. 2002. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol* 168:2255-2263.
53. Linnemeyer, P. A., and S. B. Pollack. 1993. Prostaglandin E₂-induced changes in the phenotype, morphology, and lytic activity of IL-2-activated natural killer cells. *J Immunol* 150:3747-3754.
54. Takayama, K., G. Garcia-Cardena, G. K. Sukhova, J. Comander, M. A. Gimbrone, Jr., and P. Libby. 2002. Prostaglandin E₂ suppresses chemokine production in human macrophages through the EP₄ receptor. *J Biol Chem* 277:44147-44154.
55. Edwards, C. K., 3rd, H. B. Hedegaard, A. Zlotnik, P. R. Gangadharam, R. B. Johnston, Jr., and M. J. Pabst. 1986. Chronic infection due to Mycobacterium intracellulare in mice: association with macrophage release of prostaglandin E₂ and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-gamma. *J Immunol* 136:1820-1827.
56. Hernandez-Pando, R., H. Orozco-Esteves, H. A. Maldonado, D. Aguilar-Leon, M. M. Vilchis-Landeros, D. A. Mata-Espinosa, V. Mendoza, and F. Lopez-Casillas. 2006. A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 144:264-272.
57. Rangel Moreno, J., I. Estrada Garcia, M. De La Luz Garcia Hernandez, D. Aguilar Leon, R. Marquez, and R. Hernandez Pando. 2002. The role of prostaglandin E₂ in the

immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 106:257-266.

58. Kursar, M., M. Koch, H. W. Mittrucker, G. Nouailles, K. Bonhagen, T. Kamradt, and S. H. Kaufmann. 2007. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 178:2661-2665.
59. Mason, C. M., E. Porretta, P. Zhang, and S. Nelson. 2007. CD4⁺ CD25⁺ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. *Clin Exp Immunol* 148:537-545.
60. Scott-Browne, J. P., S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan, and K. B. Urdahl. 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med* 204:2159-2169.

Figure 1: LT play a role in the resistance and protection induced by homologous DNA-HSP65 or heterologous BCG/DNA-HSP65 (prime-boost) immunization against *M. tuberculosis*. (A) WT or 5-LO^{-/-} mice were immunized and challenged with 10⁵ *M. tuberculosis* (i.t.) 30 d after immunization. Thirty days after challenge, lung bacterial load was evaluated by CFU counting. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=5 to 10). # p<0.05 in non-immunized and infected WT vs prime-boost-immunized and infected WT; ∞, p<0.05 in non-immunized and infected 5-LO^{-/-} vs prime-boost-immunized and infected 5-LO^{-/-}; * p<0.05. (B) Each bar represents the percentage of reduction in bacilli counts induced by immunization with DNA-HSP65 or prime-boost strategy.

Figure 2: Decreased inflammation in lungs of immunized and *M. tuberculosis*–challenged 5-LO^{-/-} mice. Representative H.E.-stained sections of lungs from WT or 5-LO^{-/-} mice infected with *M. tuberculosis* (B and C respectively), and WT or 5-LO^{-/-} mice immunized with prime-boost and challenged with *M. tuberculosis* (D and E, respectively). Panel A shows lung section from uninfected WT mice. Original magnification x50. (F-I) Representative acid-fast bacilli–stained sections from lungs of WT or 5-LO^{-/-} mice infected with *M. tuberculosis* (F and G, respectively), and WT or 5-LO^{-/-} mice immunized with prime-boost and challenged with *M. tuberculosis* (H and I, respectively). Original magnification, x50.

Figure 3: Absence of LT impairs recruitment of cells to the lungs of 5-LO^{-/-} mice. WT or 5-LO^{-/-} mice were immunized with prime-boost strategy and challenged with 10⁵ *M. tuberculosis* (i.t.) 30 d after immunization. Thirty days after challenge, lungs were removed, homogenized and total cell numbers were determined by counting in Neubauer chamber. Then cells were stained with fluorescence-labeled antibodies and frequency of CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ and CD11c⁺ cells were evaluated by flow cytometry. Determination of total number of cells was calculated as indicated in *Material and methods*. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=3 to 5). #, p<0.05 in *M. tuberculosis*-infected WT vs uninfected WT mice; ∞, p<0.05 in *M. tuberculosis*-infected 5-LO^{-/-} vs uninfected 5-LO^{-/-} mice; *, p<0.05.

Figure 4: Prime-boost immunized 5-LO $^{-/-}$ mice secreted low IFN- γ , and high IL-17 and PGE $_2$. WT or 5-LO $^{-/-}$ mice were immunized with prime-boost strategy and challenged with 10^5 *M. tuberculosis* (i.t.) 30 d after immunization. Thirty days after challenge, lungs were removed, homogenized and IFN- γ , IL-12, IL-17, LTB $_4$ and PGE $_2$ concentrations were determined in supernatants by ELISA, and nitrite concentrations were determined by Greiss reaction. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=4 to 9). #, $p < 0.05$ in WT mice infected with *M. tuberculosis* vs WT mice immunized with prime-boost and challenged with *M. tuberculosis*; ∞ , $p < 0.05$ in 5-LO $^{-/-}$ mice infected with *M. tuberculosis* vs 5-LO $^{-/-}$ mice immunized with prime-boost and challenged with *M. tuberculosis*; * $p < 0.05$.

Figure 5: (A) Total number of CD4⁺CD25⁺ cells in spleens of WT or 5-LO^{-/-} mice after immunization with prime-boost strategy. Animals were immunized with prime-boost and 30 d after immunization spleens were removed, CD4⁺CD25⁺ cells were isolated with magnetic beads and total number of cells from individual spleens were determined by counting in Neubauer chamber. Results are presented as mean $\pm$ SEM of cell count from spleen of each animal (n=6). (B) WT and 5-LO^{-/-} mice were treated with celecoxib p.o. (5 mg/kg/0.5 mL) or water daily during all the period of prime-boost immunization and then challenged with *M. tuberculosis*. Thirty days after challenge, lungs were removed and evaluated for the number of Foxp3⁺ cells detected by immunohistochemistry. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=4 to 5). #, p<0.05 in prime-boost-immunized and *M. tuberculosis*-challenged WT vs non-immunized *M. tuberculosis*-infected WT mice; * p<0.05. Representative immunohistochemistry for Foxp3 staining of lungs from *M. tuberculosis*-infected WT (C) or 5-LO^{-/-} (D) mice. Arrows indicates Foxp3⁺ cells. Original magnification: x200.