UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

LUANA SILVA SOARES

**Caracterização de células T *gamma-delta* e *natural killer*
na imunoterapia da tuberculose experimental com a
vacina gênica DNAhsp65**

Ribeirão Preto
- 2011 –

LUANA SILVA SOARES

Caracterização de células T *gamma-delta* e *natural killer* na imunoterapia da tuberculose experimental com a vacina gênica DNAhsp65

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Celio Lopes Silva

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Soares, Luana Silva

Caracterização de células T *gamma-delta* e *natural killer* na imunoterapia da tuberculose experimental com a vacina gênica DNAhsp65. Ribeirão Preto, 2011.

110 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Silva, Celio Lopes.

1. Tuberculose. 2. Imunoterapia. 3. DNAhsp65. 4. *Natural killer*. 5. Linfócitos T $\gamma\delta$.

Dedico essa dissertação

Aos meus amados pais Marcos e Roselene Soares, e minha irmã de coração Joana, por compartilharem comigo o amor mais puro e sincero, pela contribuição efetiva em minha formação profissional e pessoal, por confiarem em meus sonhos e me ajudarem a cumpri-los, sobretudo por serem exemplos de perseverança, amor, caráter e companheirismo, essenciais em minha vida.

A minha família representada por meus queridos avós, que me ensinaram o valor da união e do afeto ao próximo, e me proporcionaram a imensa alegria de fazer parte de tão valiosa família.

Ao meu companheiro tão paciente e carinhoso Thiago Malardo, por toda confiança e amor a mim dedicados, e sobretudo pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Aos amigos de laboratório pelas experiências trocadas no âmbito profissional e pessoal, pelo espírito de equipe e companheirismo, e por toda ajuda em todas as etapas desse trabalho.

Agradeço sinceramente

ao Prof. Dr. Celio Lopes Silva, pela orientação, apoio e atenção durante a elaboração deste trabalho, pelo exemplo de profissional empreendedor e pela contribuição efetiva em minha formação profissional e pessoal.

ao Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés, meu co-orientador, pelos valiosos ensinamentos, por todo apoio e dedicação, pelo exemplo de pesquisador e docente na busca incansável da sabedoria, sobretudo pela amizade e confiança em mim depositada. Muito obrigada por tudo, Kaká.

às docentes, Prof^ª. Dr^ª. Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo e Prof^ª. Dr^ª. Vânia Luiza Deperon Bonato pela colaboração e apoio fundamentais para execução deste trabalho.

à Prof^ª. Dr^ª. Simone Gusmao Ramos e a especialista de laboratório Elaine Medeiros Floriano pela colaboração e auxílio nos experimentos de histologia.

ao Prof. Dr. João Santana da Silva e por meio dele a todos os docentes do Programa de Imunologia Básica e Aplicada, por todos os ensinamentos e pela preocupação constante na manutenção da excelência do programa de pós-graduação.

aos membros da banca, Prof. Dr. Anderson de Sá-Nunes e Prof^ª. Dr^ª. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, pela atenção na correção e pelas sugestões e críticas construtivas que contribuíram para melhorar a qualidade do trabalho.

aos especialistas de laboratório, Izaíra Tincani Brandão, Ana Paula Masson, Wendy Martin Rios, Ana Flávia Gembre e José Seminate Filho, pelo apoio técnico essencial na confecção dos experimentos sempre com muita competência e sobretudo pela amizade. E à Sheila Severino pelo auxílio no cuidado com os materiais e animais utilizados.

à Fabiana Rossetto de Moraes, Patricia Vianna Bonini Palma e Walter Miguel Turato pelo apoio técnico na aquisição dos experimentos de citometria de fluxo, pelas conversas construtivas e pela amizade.

à secretária Ana Cristine Ferreira, pela prestatividade, competência e apoio sempre dedicados aos alunos da pós-graduação.

aos amigos de laboratório, Wendy Martin Rios, Frederico Gonzalez Colombo Arnoldi, Rodrigo Ferracine Rodrigues, Patrícia Rodrigues Marques de Souza, Rogério Silva Rosada, Izaíra Tincani Brandão, Ana Paula Masson e Nayara Trevisan dos Santos Doimo, pelo apoio constante em todas as etapas deste trabalho, pela ajuda fundamental na realização dos experimentos, pelas valiosas discussões e ensinamentos, pelo companheirismo e amizade e sobretudo por terem contribuído de forma essencial em minha formação profissional e pessoal. Se hoje sou o que sou, e sei o que sei, com certeza devo muito a vocês!

aos amigos da FARMACORE, Eduardo Dantas Casillo Gonçalves, Evanilda Ferreira da Silva, Juliana Giantomassi Machado, Jeanne Blanco de Molfetta Machado, Maria Paula Garofo Peixoto, Fabio Cícero de Sá Galetti, Helena Faccioli Lopes Bergamin, Rogerio Sousa de Carvalho e Vanessa Cristina Cabulon, pelo auxílio, apoio e amizade.

aos amigos de laboratório da Prof^a. Dr^a. Vânia Luiza Deperon Bonato, Cássia Alves Sérgio, Rafael de Queiroz Prado, Annie Rocio Piñeros Alvarez, Paola Fernanda Fedatto, Marina Oliveira e Paula Passanezi, Livia Weijenborg Campos, Denise Moraes da Fonseca e Luís Henrique Franco pela amizade, conversas e discussões construtivas e auxílio nos experimentos.

aos amigos de laboratório da Prof^a. Dr^a. Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo, Thiago Malardo, Renata Ariza Marques Rossetti, Bernardo Pereira Moreira, Isabela Cardoso Fontoura e Luciana Previato de Almeida pela amizade, ajuda nos experimentos e por compartilharem o conhecimento e experiências laboratoriais.

aos amigos de laboratório da Profa. Dra. Lucia Helena Faccioli, Elyara Maria Soares, Milena Sobral Espíndola, Adriana Secatto Sarti, Claudia da Silva Bitencourt, Priscila Tartari, Ana Carolina Pagliaroni e Carlos Artério Sorgi pela amizade, apoio e auxílio nos experimentos.

aos amigos Vinicius Antonio Hiroaki Sato e Evanilda Ferreira da Silva pelo acolhimento, amizade, paciência, apoio, e, sobretudo por terem constituído minha família em Ribeirão Preto.

aos amigos Diogo Campos Vesenick, Natália Aparecida de Paula, Priscila Rumi Yamaoka, Andressa Megumi Niwa, Lucimara Aparecida Sensiate, Priscila Cassolla pelo apoio constante, pela fiel amizade, pelas alegrias, risadas, tristezas, encontros e desencontros sempre compartilhados com muito carinho.

a minha família, especialmente aos meus pais Marcos e Roselene, a minha tia Joana e aos meus avós, pelo amor e apoio incondicional sempre presentes, mesmo com a distância.

aos amigos do Livre Pedal, pela amizade e horas de distração e lazer, especialmente à Wendy Martin Rios e Fernando José Gisoldi, por todo apoio, amizade, companheirismo e confiança.

aos estudantes de pós-graduação e de outros laboratórios, pela amizade, auxílio em dúvidas técnicas e institucionais, cordialidade e empréstimo de equipamentos e reagentes.

às agências financiadoras, FAPESP (processo 2009/04544-0), CAPES, CNPq, FAEPA, pelo apoio financeiro essencial para a realização da pesquisa.

“Há mais coisas entre o céu e a terra do que supõe a nossa vã filosofia”

William Shakespeare

RESUMO

SOARES, L. S. **Caracterização de células T *gamma-delta* e *natural killer* na imunoterapia da tuberculose experimental com a vacina gênica DNAhsp65**. 2011. 110f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde declarou a tuberculose (TB) como uma emergência global devido à sua relevância epidemiológica e a necessidade de seu controle. Atualmente, a TB ainda é considerada um problema de saúde pública e requer o desenvolvimento de vacinas e terapias que sejam mais eficazes na sua prevenção e tratamento. Nesse sentido, o Laboratório de Vacinas Gênicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto estuda há mais de dez anos a eficácia da vacina gênica DNAhsp65 na profilaxia e terapia da TB. Com o intuito de complementar o conhecimento existente sobre os mecanismos imunes desencadeados pela vacina DNAhsp65, assim como sua associação às drogas convencionais utilizadas no tratamento da TB, objetivou-se neste trabalho a caracterização de células *natural killer* (NK), T *natural killer* (NKT), e T $\gamma\delta$ na imunoterapia da tuberculose experimental com a vacina DNAhsp65, no tratamento com as drogas rifampicina (RIF) e isoniazida (INH), e na associação DNAhsp65-drogas. Inicialmente, camundongos BALB/c foram infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) cepa H37Rv no dia 0 e nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção, foi promovida a eutanásia dos animais infectados ou não (controle) para análise das células T não convencionais no pulmão por citometria de fluxo. No dia 30 após a infecção, os animais infectados receberam os diferentes tratamentos: vacina DNAhsp65, vetor pVAX1, drogas RIF e INH, ou as drogas em associação à vacina. Dez dias após o fim dos tratamentos, foi promovida a eutanásia dos animais para análise das populações celulares no pulmão e linfonodo por citometria de fluxo, imunohistoquímica e PCR em tempo real. Os animais somente infectados com Mtb apresentaram aumento significativo no número das células NK ($CD3^+CD49b^+$), NKT ($CD3^+CD49b^+$) e T $\gamma\delta$ ($CD3^+\gamma\delta^+$) logo na primeira semana após a infecção, e esta diferença em relação aos animais controle permaneceu em até 70 dias após a infecção. Entre as células NK presentes no pulmão, observou-se predominância da subpopulação $CD11b^{high}CD27^{low}$ em todos os animais. Nos animais infectados, verificou-se aumento significativo das subpopulações de NK: $CD11b^{high}CD27^{high}$ e $CD11b^{low}CD27^{high}$, nos dias 7 e 15 e somente no dia 15 após a infecção, respectivamente. Entre a população de células T $\gamma\delta$ presentes no pulmão, houve predomínio do fenótipo $CD27^-$ em animais controles e infectados nos diferentes tempos experimentais. Quanto aos animais infectados com Mtb e tratados com DNAhsp65, verificou-se aumento significativo de células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ e IL-17 no pulmão, e apesar de não ter sido observada diferença na frequência de células NK e NKT neste grupo, as células NK apresentavam maior expressão da molécula FasL relacionada à morte celular induzida por apoptose. Nos grupos drogas e DNAhsp65-drogas observou-se aumento da frequência de células T $\gamma\delta$ no pulmão, assim como aumento de células NK produtoras de IL-10 e que expressavam o marcador de ativação CD69. Os resultados deste trabalho mostram mais uma vez a eficácia da vacina DNAhsp65 e da associação DNAhsp65-drogas no tratamento de animais infectados com Mtb e sugerem que células T não convencionais como as células NK, NKT e T $\gamma\delta$ podem participar na modulação da resposta imune na TB. Estes achados devem ser levados em consideração no desenho de novas estratégias terapêuticas e também profiláticas para a TB.

Palavras-chave: Tuberculose. Imunoterapia. DNAhsp65. *Natural killer*. Linfócito T $\gamma\delta$.

ABSTRACT

SOARES, L. S. **Characterization of gamma-delta T cells and natural killer cells in the immunotherapy of experimental tuberculosis with DNAhsp65 genetic vaccine.** 2011. 110f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

In 1993, the World Health Organization declared tuberculosis (TB) as a global emergence due to its epidemical relevance and the need to improve its control. Nowadays, TB still remains a public health problem and requires the development of more effective vaccines and therapies. In this sense, the Laboratory of Genetic Vaccines from the School of Medicine of Ribeirão Preto studies, for more than ten years, the efficiency of the genetic vaccine DNAhsp65 in TB prophylaxis and therapy. In order to complement the knowledge about the immune mechanisms triggered by DNAhsp65 vaccine and by its association with conventional drugs used in TB, our aim in this work was to characterize natural killer (NK), natural killer T (NKT) and gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in the immunotherapy of experimental tuberculosis with the DNAhsp65 vaccine, in the treatment with rifampicin and isoniazid drugs and in the association DNAhsp65-drugs. Initially, BALB/c mice were infected with Mtb strain H37Rv on day 0, and on days 1, 7, 15, 30 and 70 after infection, infected animals or not (control) were euthanized for lung cell analysis by flow cytometry. On day 30 after infection, infected animals received the following treatment: DNAhsp65 vaccine, pVAX1 vector, rifampicin and isoniazid drugs, or drugs in association with DNAhsp65. Ten days after the end of treatment, animals were euthanized for lung and lymph node cell analysis by flow cytometry, immunohistochemistry and real time PCR. Infected animals showed a significant increase of NK ($CD3^+CD49b^+$), NKT ($CD3^+CD49b^+$) and $\gamma\delta$ ($CD3^+\gamma\delta^+$) T cells in the first week of infection and this difference compared to control animals remained until 70 days after infection. Within the lung NK cell population, we observed a predominance of $CD11b^{high}CD27^{low}$ phenotype in all animals. In infected animals, we verified a significant increase of the following NK cell subpopulations: $CD11b^{high}CD27^{high}$ and $CD11b^{low}CD27^{high}$ on days 7 and 15, and only on day 15 after infection, respectively. Within the lung $\gamma\delta$ T cell population, there was a predominance of $CD27^-$ $\gamma\delta$ T cell in control and infected animals in the different experimental times. In infected animals and subsequently vaccinated with DNAhsp65, we verified a significant increase in $\gamma\delta$ T cells producing IFN- γ and IL-17 in the lungs. Although we have not seen any differences in NK and NKT cells in this group, NK cells showed higher expression of FasL molecule related to induced cell death by apoptosis. In DNAhsp65-drugs and drugs groups, we observed an increase in lung $\gamma\delta$ T cells frequency, as well as increase in NK cells producing IL-10 and expressing CD69, an activation marker. Our results confirm the effectiveness of DNAhsp65 vaccine and its association with drugs in Mtb infected animals and suggest a modulation in the immune response through unconventional T cells such as NK, NKT and $\gamma\delta$ T cells. These findings should be taken into consideration in the design of new therapeutic and prophylactic strategies for TB.

Key words: Tuberculosis. Immunotherapy. DNAhsp65. Natural Killer. $\gamma\delta$ T lymphocyte.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1. Epidemiologia e etiopatologia da Tuberculose	12
1.2. Resposta imune na TB	14
1.3. Participação de células T não convencionais na resposta imune da TB	19
1.3.1. Células <i>natural killer</i>	20
1.3.2. Células T <i>natural killer</i>	23
1.3.3. Células T $\gamma\delta$	25
1.4. Estratégias profiláticas e terapêuticas na TB	28
1.5. Vacina DNAhsp65 e suas implicações na TB	30
2. Objetivos.....	34
2.1 Objetivo Geral	35
2.2. Objetivos Específicos	35
3. Materiais e métodos.....	36
3.1. Animais.....	37
3.2. Delineamento Experimental	37
3.3. Infecção dos animais com Mtb	39
3.3.1. Preparo do inóculo de Mtb	39
3.3.2. Infecção experimental.....	39
3.4. Tratamento dos animais com a vacina DNAhsp65 e/ou com as drogas rifampicina e isoniazida.....	40
3.4.1 Obtenção da vacina gênica DNAhsp65	40
3.4.2. Drogas rifampicina e isoniazida	41
3.4.3. Protocolo de imunoterapia e tratamento dos animais.....	41
3.5. Avaliação dos efeitos da imunoterapia e tratamento dos animais	42
3.5.1. Determinação da carga bacilar no pulmão, baço e fígado	42
3.5.2. Análise das populações celulares específicas	43
3.5.2.1. Obtenção das células totais do pulmão.....	43
3.5.2.2. Obtenção das células totais do linfonodo	44
3.5.2.3. Avaliação das células T não convencionais por citometria de fluxo.....	44
3.5.3. Avaliação da produção de citocinas por células específicas do pulmão	45
3.5.3.1. Avaliação da produção de citocinas pelas células NK e T $\gamma\delta$ por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (<i>Real-time PCR</i>)	45
3.5.3.1.1. Separação das células NK e T $\gamma\delta$	45
3.5.3.1.2. Extração de RNA total das células NK e T $\gamma\delta$ e reação de transcrição reversa (RT-PCR)	45
3.5.3.1.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (<i>Real-time PCR</i>)	46
3.5.3.2. Avaliação da produção de citocinas pelas células totais do pulmão por meio da técnica de ELISPOT	47
3.5.4. Análise histológica do pulmão dos animais	48
3.5.4.1. Avaliação do infiltrado inflamatório no pulmão	48
3.5.4.2. Marcação das células NK e T $\gamma\delta$ in situ	48
3.5.5. Análise estatística	49
4. Resultados	50
4.1. Avaliações realizadas em diferentes tempos experimentais após infecção com Mtb	51
4.1.1. Determinação da carga bacilar no pulmão, baço e fígado	51
4.1.2. Análise das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ no pulmão dos animais.....	52
4.1.2.1. Células <i>natural killer</i>	54

4.1.2.2. Células T <i>natural killer</i>	56
4.1.2.3. Células T $\gamma\delta$	57
4.2. Avaliações realizadas em animais infectados com Mtb e que receberam os diferentes tratamentos	59
4.2.1. Determinação da carga bacilar no pulmão, baço e fígado	59
4.2.2. Análise histológica do pulmão	61
4.2.3. Determinação da produção de citocinas pelas células no pulmão dos animais.....	61
4.2.4. Análise das células T não convencionais no pulmão	63
4.2.4.1. Análise das populações celulares <i>in situ</i>	63
4.2.4.2. Quantificação das células <i>natural killer</i> no pulmão dos animais	66
4.2.4.3. Quantificação das células T <i>natural killer</i> no pulmão dos animais.....	68
4.2.4.4. Quantificação das células T $\gamma\delta$ no pulmão dos animais	69
4.2.5. Análise da expressão de citocinas e marcadores de ativação em células NK e T $\gamma\delta$ por PCR em tempo real.....	70
4.2.6. Quantificação das células T não convencionais no linfonodo dos animais.....	73
4.2.6.1. Células <i>natural killer</i>	73
4.2.6.2. Células T <i>natural killer</i>	75
4.2.6.3. Células T $\gamma\delta$	76
5. Discussão	78
6. Conclusões	90
7. Referências Bibliográficas	92

1.Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia e etiopatologia da Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença que remonta à antiguidade, e, nessa época, também era conhecida como escrófula e peste cinzenta (Donoghue, 2011); e até os dias de hoje permanece como um problema de saúde pública global. Estima-se que em 2009, a prevalência dos casos de TB era de cerca de 14 milhões, ou seja, 200 casos a cada 100 000 habitantes. O maior número de casos em 2009 foi detectado na Ásia (55%), seguido da África (30%), Leste Mediterrâneo (7%), Europa (4%) e Américas (3%), sendo que a Índia e a China são os dois países com maior incidência da doença (World Health Organization, 2010). Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil tem uma média de 80 mil novos casos por ano e estima-se que mais de 50 milhões de brasileiros estejam infectados (Ministério da Saúde, 2009).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde considerou a TB como uma emergência global devido à sua relevância epidemiológica e a necessidade de seu controle (World Health Organization, 1993). Atualmente, um terço da população mundial (~ 2,2 bilhões de indivíduos) encontra-se infectada com o bacilo da TB, no entanto, a maioria dos indivíduos não progride para a doença ativa e permanece com a infecção latente (Kaufmann, 2010). Apesar disso, em 2009 foram relatadas 1,7 milhões de mortes relacionadas a essa patologia (World Health Organization, 2010). Essa estatística é preocupante principalmente devido ao aumento no número de casos de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a TB (HIV-TB), o que eleva em 10% a probabilidade da doença tornar-se ativa no primeiro ano de co-infecção (Kaufmann & McMichael, 2005). Outro agravante é o crescimento no número de casos multi-drogas resistentes (MDR) e o surgimento de cepas extensivamente resistentes (XDR) às drogas de primeira e segunda linha. Até julho de 2010, 58 países já haviam reportado pelo menos um caso de XDR. Nesses casos o tratamento é mais difícil, dispendioso e possui alta taxa de falha, uma vez que as cepas MDRs são resistentes às drogas isoniazida e rifampicina, enquanto as XDRs são resistentes a estas duas drogas, à fluoroquinolona e no mínimo mais um agente de segunda linha injetável (amicacina, canamicina e/ou capreomicina) (World Health Organization, 2010).

Nos últimos anos vários esforços têm sido realizados no sentido de diminuir a incidência da TB ao redor do mundo. A “Stop TB Partnership” constitui-se de um grupo de

várias organizações internacionais administradas pela Organização Mundial da Saúde que atuam no intuito de melhorar o quadro global da TB. Dentre as principais metas dessa associação estão: diminuir a prevalência e taxa de mortalidade em 50% comparado aos níveis de 1990 até o ano de 2015; e diminuir a incidência global da TB ativa em menos de 1 caso por 1 milhão de pessoas/ano até 2050 (World Health Organization, 2010). Apesar desses esforços, a situação da TB no mundo ainda é negligenciada por ser uma doença que acomete em maior grau os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, e por acreditarem que nos países desenvolvidos essa doença está controlada. No entanto, esta última observação desconsidera o processo de globalização e migração entre os países, que acaba por contribuir para o avanço da TB no mundo como um todo (Blumberg *et al.*, 2010). Além disso, com o aumento dos casos de co-infecção HIV-TB e de cepas MDRs e XDRs (Gandhi *et al.*, 2010) fica evidente que maior importância deve ser dada por esses países para que a situação não se agrave ainda mais. Segundo o comentário de Pamela Das e Richard Horton publicado na revista Lancet em 2010, dentre os pontos que devem ser acelerados nos esquemas de intervenção da TB estão a detecção rápida e precoce da doença, e maior atenção na prevenção de novos casos; aspectos estes que podem ser melhorados por meio de estratégias econômicas e sociais como: evitar a superlotação em domicílios, diminuir a incidência de casos de má nutrição e melhorar o acesso das pessoas ao tratamento, entre outros fatores. No entanto, tais medidas não descartam a necessidade do desenvolvimento de vacinas e tratamentos mais eficazes na TB para melhorar significativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas por esta doença.

Uma pessoa é considerada suspeita de possuir TB caso apresente sintomas ou sinais sugestivos desta doença. Sob o aspecto clínico, a TB pode ser dividida nas formas: pulmonar e extra-pulmonar. TB pulmonar refere-se a casos de TB que acometem o parênquima pulmonar, enquanto a forma extra-pulmonar envolve outros órgãos como a pleura, linfonodos, abdômen, trato genitourinário, pele, articulações, ossos e meninges. O sintoma mais comum associado à TB pulmonar é tosse por mais de duas semanas, que pode ser acompanhada de sintomas respiratórios (dificuldade de respirar, dores no peito, hemoptise) e/ou sistêmicos (perda de apetite, perda de peso, febre, suores noturnos e fadiga) (World Health Organization, 2009). O sítio primário da infecção no pulmão denomina-se foco de Ghon e localiza-se geralmente na parte superior do lobo inferior e na parte inferior do lobo superior do órgão. Estas lesões tornam-se calcificadas e acometem também o linfonodo, passando a ser denominadas complexo de Ghon. Estes complexos estão envolvidos na retenção de bactérias viáveis e podem estar associados ao fenômeno de reativação da doença em indivíduos que não conseguem eliminar completamente o bacilo (Curvo-Semedo *et al.*, 2005).

De forma geral, a classificação dos casos de TB é realizada segundo os critérios: sítio anatômico da doença, resultado bacteriológico, histórico de tratamento prévio e presença ou não de infecção por HIV (World Health Organization, 2009). Enquanto seu diagnóstico baseia-se na detecção do bacilo em amostras clínicas como escarro e análise do raio-X do paciente. Também podem ser realizados o teste da tuberculina e outros testes moleculares mais recentes baseados sobretudo na produção da citocina IFN- γ por células responsivas a alguns antígenos específicos do bacilo, ou ainda na detecção do bacilo pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Bento *et al.*, 2011).

Diante da importância da TB no mundo e da necessidade de seu controle torna-se imprescindível o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que sejam mais eficazes com o intuito de melhorar o quadro epidemiológico existente atualmente. Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação patógeno versus hospedeiro caracteriza-se como uma etapa importante deste processo e tem sido alvo de muitos estudos relacionados a essa área nos últimos tempos (Pulendran & Ahmed, 2011).

1.2. Resposta imune na TB

O principal agente etiológico da TB em humanos denomina-se *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), e foi primeiramente descrito por Robert Koch e relatado em uma reunião científica em 24 de março de 1882. Em reconhecimento à importância desse dia, a Organização Mundial da Saúde declarou essa data como o “Dia Mundial da Tuberculose” (Kaufmann & Schaible, 2005). Existem ainda outras espécies pertencentes ao complexo Mtb que podem causar doença em humanos como: *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti* e *M. africanum*; este último descrito como principal agente causador da TB em algumas partes da África (Niemann *et al.*, 2002; Cosma *et al.*, 2003).

A principal micobactéria causadora da TB (Mtb) caracteriza-se por ser um bacilo álcool-ácido resistente, possuir genoma rico em sequências de DNA repetitivo, sendo que 65,6% é composto pelas bases nitrogenadas: guanina e citosina, e conter uma parede celular espessa de peptidoglicana (de 10 a 15 nm), além de uma camada adicional constituída de lipídios, glicolipídios e polissacarídeos. É descrita como um patógeno intracelular obrigatório, de crescimento lento, sendo seu tempo de geração de aproximadamente 24 horas, o que contribui em parte para a natureza crônica da doença (Cole, 1998).

As características fenotípicas relacionadas à micobactéria juntamente com o perfil do hospedeiro irão determinar o curso da infecção por Mtb. A infecção ocorre pela inalação de bacilos via aerossol, sendo que aproximadamente 90% das pessoas infectadas geralmente desenvolvem a infecção latente e não apresentam sinais clínicos, enquanto os 10% restantes evoluem para a forma progressiva da doença (Rook *et al.*, 2005). Em seguida, a micobactéria alcança as vias aéreas inferiores onde é fagocitada pelos macrófagos alveolares residentes, assim como por células dendríticas e monócitos recrutados da corrente sanguínea; sendo este processo mediado por receptores presentes na membrana destas células, principalmente o receptor do complemento 3 (CR3) (Schlesinger *et al.*, 1990; Bhatt & Salgame, 2007). Alguns bacilos permanecem no parênquima pulmonar, enquanto outros são transportados para os linfonodos drenantes via células dendríticas. Para indução da resposta imune é necessária a disseminação da bactéria do pulmão para o linfonodo drenante (Wolf *et al.*, 2008). Sabe-se que a ativação das células T não ocorre antes do nono dia após infecção via aerossol e que a resposta imune adaptativa demora de 18 a 20 dias para alcançar um nível efetor capaz de conter o crescimento bacteriano; atuando, então, nesse período inicial os mecanismos efetores da resposta imune inata (Cooper *et al.*, 2009).

O primeiro passo para que ocorra o desenvolvimento da resposta imune direcionada ao microrganismo invasor como Mtb é o reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs – *Pathogen-associated Molecular Patterns*), presentes na micobactéria, por meio dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs – *Pattern Recognition Receptors*) específicos, encontrados nas células do hospedeiro (Kawai & Akira, 2009). Em seguida, ocorre o desenvolvimento da resposta inflamatória com a ativação da cascata de sinalização intracelular que culmina na indução da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além da ativação de processos relacionados à fagocitose e morte do microrganismo, assim como a apresentação antigênica (Medzhitov, 2008). Os principais receptores do tipo Toll (TLR – *Toll like receptor*) envolvidos na identificação dos PAMPs de Mtb são: TLR2, que se liga a peptidoglicanas e aos componentes de origem glicolipídica da parede celular micobacteriana como a lipoproteína de 19-kDa; TLR4, o qual se liga às proteínas de choque térmico de 60 e 65 kDa de várias espécies de Mtb; e TLR9, envolvido no reconhecimento de motivos CpG não-metilados presente no DNA bacteriano (Bhatt & Salgame, 2007; Korbel *et al.*, 2008; Dorhoi & Kaufmann, 2009; Tsan & Gao, 2009; Souza, 2011).

Existem ainda outros receptores envolvidos no reconhecimento inicial da micobactéria como os receptores do tipo NOD (NLRs – *Nucleotide Oligomerization Domain Receptors*),

em especial o NLR2, descrito como receptor para peptidoglicanas, expresso principalmente por células apresentadoras de antígenos e células epiteliais; dectina-1, receptor para polímeros de beta-glucana, expresso principalmente em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e um subtipo de células T; as lectinas tipo C, conhecidas por se ligarem a estruturas de origem polissacarídica dos patógenos, como o receptor de manose que é altamente expresso em macrófagos alveolares, o DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), presente em macrófagos e células dendríticas, e o Mincle (*Macrophage-inducible C-type lectin*), expresso principalmente em macrófagos. A ativação das células pelos receptores do tipo Toll e Mincle geralmente induz uma resposta imune de perfil Th1. Enquanto a ativação via Dectina-1 e Mincle favorecem o desenvolvimento de células Th17. E por outro lado, a sinalização via DC-SIGN está envolvida em funções supressoras e de exaustão das células. É necessário um balanço adequado entre essas vias para o desenvolvimento da resposta imune efetora eficaz contra o patógeno (Korbel *et al.*, 2008; Dorhoi & Kaufmann, 2009; Kaufmann, 2010).

Os macrófagos e as células dendríticas são as principais células envolvidas no reconhecimento inicial de Mtb e na ativação dos mecanismos subsequentes para eliminação do bacilo. No entanto, a micobactéria é capaz de sobreviver no interior destas células devido ao desenvolvimento de mecanismos de escape da resposta imune como: neutralização do pH do fagossomo, escape para o citosol, inibição da apoptose através da produção de prostaglandinas, entre outros (Kaufmann, 2010).

A partir de estudos em modelos animais, concluiu-se que nas três primeiras semanas após a infecção com Mtb, o crescimento bacteriano ocorre em escala logarítmica. Em seguida, observa-se que o número de bacilos viáveis não varia muito, permanecendo constante, evento este que se correlaciona à detecção da expressão da imunidade adaptativa mediada por células nos animais (Dannenberg & Collin, 2001). Concomitantemente ao desenvolvimento da imunidade adquirida, ocorre a formação de estruturas denominadas granulomas, compostas por células do sistema imune, e que contribuem inicialmente no controle do avanço da infecção. Após fagocitose da micobactéria pelos macrófagos alveolares no pulmão, é desencadeada uma cascata de sinalização intracelular resultando na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as quais auxiliam no recrutamento de células mononucleares do sangue, sendo que a principal citocina envolvida nesse processo é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*) (Algood *et al.*, 2005). Ao início da infecção também ocorre o recrutamento de polimorfonucleares como os neutrófilos que pode ser promovido pela produção de leucotrienos e das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , como

descrito por Peres *et al.*, 2007. Neste estágio da infecção, o centro do granuloma é constituído por macrófagos infectados, monócitos e macrófagos espumosos (assim denominados pela presença de gotículas lipídicas em seu interior); os quais são circundados por linfócitos (Russel *et al.*, 2009). Nesse período, o avanço da infecção é de certa forma controlada, no entanto existem evidências de que a micobactéria também possa beneficiar-se com a formação do granuloma (Cosma *et al.*, 2008; Davis & Ramakrishnan, 2009; Volkman *et al.*, 2010). À medida que a infecção progride, diversos tipos de macrófagos acumulam-se no interior do granuloma, o qual passa a ser delimitado por uma camada fibrosa. Na maioria das pessoas essa estrutura contém o microrganismo em seu interior e não evolui para a doença ativa. No entanto, pode ocorrer a progressão da doença, caracterizada pela presença de necrose caseosa no centro do granuloma, que por sua vez, pode liquefazer-se e resultar em cavitações, responsáveis pelo espalhamento do bacilo nas vias aéreas, possibilitando sua transmissão via gotículas de Flugge (Saunders & Britton, 2007; Russel *et al.*, 2009).

Concomitantemente à formação do granuloma no pulmão, ocorre nos linfonodos drenantes, a ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pelas células dendríticas que migraram do pulmão no início da infecção. Nos linfonodos, estas células exercem a importante função de apresentação antigênica para os linfócitos T virgens via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) de classes I e II, auxiliando dessa forma na ativação, proliferação e diferenciação de células T efetoras (Cooper, 2009). A ativação de linfócitos T CD8⁺ via MHC de classe I pode ocorrer pela via clássica de processamento e apresentação antigênica, ou ainda, por meio do mecanismo de apresentação cruzada após captura de vesículas apoptóticas pelas células dendríticas (Schaible *et al.*, 2003). Interessantemente, a importância da função das células dendríticas na ativação da resposta imune adaptativa durante a TB foi demonstrada no trabalho de Tian *et al.*, em 2005, onde camundongos deficientes destas células apresentavam demora na resposta de células T CD4⁺ e agravamento da doença.

As células dendríticas, estimuladas por Mtb, ao secretarem IL-12 e IL-18 promovem a diferenciação dos linfócitos para um padrão Th1, e na presença de TGF- β e IL-6 ocorre a polarização para o padrão Th17 (Dorhoi & Kaufmann, 2009). Estes linfócitos diferenciados, por sua vez, migram para o sítio primário da infecção via gradiente de quimiocinas e citocinas e executam suas funções de acordo com seu fenótipo específico. As células Th1 atuam através da produção das citocinas IL-2, IFN- γ , linfotóxina e TNF- α . O IFN- γ é descrito como uma das citocinas mais importantes no controle de Mtb, por estar envolvido na ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, como a indução da produção de intermediários

reativos de oxigênio e nitrogênio que medeiam a morte do microrganismo (Flynn & Chan, 2001; Cooper, 2009). Enquanto isso, as células Th17 possuem função na formação do granuloma através da secreção de IL-17 que atua no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio infeccioso (Nembrini *et al.*, 2009). Vários trabalhos demonstram a importância das células T CD4⁺ no controle da infecção por Mtb, visto que a parada no crescimento bacteriano ocorre concomitantemente à chegada dessas células produtoras de IFN- γ no pulmão e a ausência das mesmas agrava o quadro patológico da TB (Orme *et al.*, 1992; Havlir & Barnes, 1999; Chackerian *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2005). No entanto, na maioria das vezes os mecanismos desencadeados por estes linfócitos auxiliares não é capaz de eliminar completamente o microrganismo, o que pode resultar na reativação da doença durante um estado de imunossupressão (Gallegos *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2005). Além disso, outros estudos sugerem que estas células podem, por outro lado, contribuir na patologia caso sua função não seja devidamente regulada (Barber *et al.*, 2011).

Os linfócitos T CD8⁺ ou citolíticos também atuam na resposta imune protetora contra Mtb através da secreção do conteúdo dos seus grânulos contendo perforina e granzimas, que são capazes de lisar as células hospedeiras, causando a morte do bacilo (Stegelmann *et al.*, 2005). Também tem sido descrita a participação das células B nesse cenário, no entanto sua exata função não está totalmente elucidada. Camundongos deficientes de células B e infectados com altas doses de micobactéria tornam-se mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença, com agravamento do quadro patológico devido entre outras coisas ao aumento no influxo de neutrófilos, influenciando na composição celular no local da infecção (Vordermeier *et al.*, 1996; Maglione *et al.*, 2007).

Na maioria dos modelos animais empregados para estudo da TB, observa-se que a imunidade adaptativa possui papel importante no controle da infecção por Mtb, no entanto, é incapaz de eliminar completamente o microrganismo. As possíveis falhas dessa resposta relacionam-se em sua maioria a disfunções nos macrófagos, que apesar de ativados pelas células T não são capazes de eliminar a bactéria, talvez por influência do próprio patógeno ou do microambiente inflamatório. Além disso, essa observação é um forte indício de que a resposta das células T está sujeita a potente regulação durante a patogênese da TB (Cooper, 2009).

As células T regulatórias são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e representam em torno de 5 a 10% do total de linfócitos T CD4⁺ (Fontenot *et al.*, 2005). A princípio, acreditava-se que estas células atuavam diminuindo a resposta imune contra um patógeno após sua erradicação para não exacerbar o quadro patológico (Mittrücker

& Kaufmann, 2004). Estudos com camundongos RAG1^{-/-}, ou seja, deficientes de células T, infectados com Mtb e que receberam por transferência adotiva células T auxiliares juntamente com células T regulatórias, demonstraram diminuição na frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e menor proliferação das células transferidas. Essa função regulatória parecia não estar associada à produção das citocinas IL-10 e TGF- β por estas células (Kursar *et al.*, 2007). Tais observações juntamente com outros dados da literatura sugerem, portanto, que estas células afetam a habilidade das células T efetoras em mediar a resposta imune protetora a Mtb (Scott-Browne *et al.*, 2007).

Existem ainda outros mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune durante a TB. Em humanos, a doença ativa correlaciona-se com aumento nos níveis de produção de IL-10 (Olobo *et al.*, 2001). Em estudos com camundongos que super expressam essa citocina, o crescimento bacteriano não é controlado eficientemente (Turner *et al.*, 2002); e por sua vez, animais com deficiência de IL-10 demonstraram redução na carga bacteriana, que foi associada ao influxo de células produtoras de IFN- γ (Redford *et al.*, 2010). Outras moléculas envolvidas nessa regulação são o CTLA-4 e PD-1, este último descrito recentemente como envolvido na regulação de células T CD4⁺ durante a infecção por Mtb, visto que camundongos deficientes dessa molécula inibitória desenvolveram lesões pulmonares necróticas com alta carga bacilar e rapidamente sucumbiram à infecção (Barber *et al.*, 2011). Além disso, em casos de co-infecção de Mtb com outros patógenos, como o vírus da AIDS (AIDS - *Acquired immune deficiency syndrome*) e helmintos, as funções da imunidade adaptativa protetora na TB podem ser diminuídas, impedindo a resolução da infecção (Havlir & Barnes, 1999; Potian *et al.*, 2011).

1.3. Participação de células T não convencionais na resposta imune da TB

Estudos anteriores já sugeriam a participação de células T não convencionais como as células *natural killer* (NK), T *natural killer* (NKT) e T $\gamma\delta$ na resposta imune da TB (Denis, 1994; Behar *et al.*, 1999; Janis *et al.*, 1989). A partir de observações de que dois terços das pessoas em íntimo contato com pacientes acometidos pela TB apresentavam resultado negativo para o teste cutâneo da tuberculina (PPD), passou-se a suspeitar de que existissem outros mecanismos, além da resposta adaptativa de células T, envolvidos na eliminação do

patógeno. Isto porque o PPD baseia-se na detecção da resposta de hipersensibilidade do tipo tardio contra antígenos de *Mtb*. Uma reação negativa pode sugerir que a pessoa não tenha tido contato com o microrganismo, ou ainda, pode indicar a existência de mecanismos da imunidade inata anteriores ao reconhecimento e à ativação dos linfócitos T, e que foram capazes de controlar e eliminar a infecção (Barnes *et al.*, 2009). Além disso, com o aumento no número de casos de co-infecção HIV-TB (World Health Organization, 2010), torna-se necessário o estudo de outras populações celulares que possam exercer função tão importante quanto os linfócitos T CD4⁺ para ajudar na eliminação do patógeno na TB.

Nesse sentido, tem crescido o interesse no estudo das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ que foram anteriormente classificadas como pertencentes à imunidade inata por apresentarem, a princípio, as seguintes características: dependem da expressão dos genes da linhagem germinativa para que ocorra o reconhecimento antigênico, são rapidamente ativadas, tornam-se funcionais durante a fase inicial das infecções e não aumentam durante repetidas exposições ao mesmo antígeno. No entanto, esse conceito tem sido bastante discutido após observação de que estas células podem, dependendo da situação, apresentar fenótipo de memória, característico da imunidade adaptativa; além de possuírem diversidade maior de receptores do que pensavam inicialmente (Biron, 2010; Modlin & Sieling, 2005). Portanto, maior importância tem sido dada a estas populações celulares pela sua atuação no início da resposta imune, na regulação do desenvolvimento das células T de caráter “adaptativo”, assim como numa fase mais tardia, o que em conjunto tem tornado interessante a escolha destas células como alvo de terapias e vacinas, em específico na TB.

1.3.1. Células *natural killer*

As células NK foram primeiramente identificadas em 1975 e descritas como linfócitos grandes e granulares com citotoxicidade natural contra células tumorais (Kiessling *et al.*, 1975). Depois passaram a ser classificadas como linhagem linfocítica distinta com funções efetoras específicas, constituindo a linha de defesa inicial não somente contra tumores, mas também contra infecções (Vivier *et al.*, 2008). São classificadas como componentes da imunidade inata, mas possuem importante papel na modulação da imunidade adaptativa (Andoniou *et al.*, 2008). Essas células expressam em sua superfície conjunto de receptores específicos denominados receptores de ativação ou de inibição, além de vários TLRs e CD16

(receptor para a porção Fc dos anticorpos). A resposta da célula NK ao estímulo vai depender da transdução de sinal desencadeada após ativação dos receptores específicos. Os receptores de inibição reconhecem moléculas de MHC de classe I expressas nas células-alvo, o que impede, na maioria das vezes, a ação das células NK sobre células próprias, a não ser que estejam alteradas como ocorre nos tumores e infecções. Além disso, existe um limite crítico de sinalização em que a ativação dos receptores de ativação pode exceder a inibição desencadeada pelos receptores inibitórios, propiciando a montagem de uma resposta imune produtiva (Lanier, 2008). No geral, as células NK interagem não somente com células alteradas, mas também com outros leucócitos, incluindo macrófagos e células dendríticas. Essa interação pode ocorrer de forma direta através da ligação entre receptores ou de forma indireta, mediada pela ação das citocinas (Moretta, 2002).

As células NK podem ser encontradas em órgãos linfóides e não-linfóides, sendo que em camundongos, estas células estão presentes em maior frequência no pulmão, seguido do fígado e sangue periférico. No pulmão dos animais, as células NK representam em torno de 10% dentro da população de linfócitos e são geralmente definidas segundo o fenótipo: $NK1.1^+ CD3^-$ ou $CD49b^+ CD3^-$, por citometria de fluxo. Por sua vez, em humanos, as células NK são definidas como $CD56^+ CD3^-$ e são encontradas em grande quantidade no fígado, onde constituem de 30 a 50% dos linfócitos totais (Colucci *et al.*, 2003; Grégoire *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2011).

De acordo com o estágio de maturação, as células NK são divididas em subpopulações, diferenciadas conforme a expressão de diversos receptores com funções distintas e que diferem entre humanos e camundongos. Células NK de humanos subdividem-se em duas subpopulações conforme a expressão da molécula CD56: $CD56^{bright}$, caracterizada por produzir altos níveis de citocinas e expressar CCR7, envolvido na migração para os órgãos linfóides secundários; e $CD56^{dim}$, que possui alta expressão dos receptores do tipo KIR (KIR – *killer cell immunoglobulin-like receptor*), contém maior quantidade de grânulos citotóxicos (perforina e granzima) e exibem maior atividade citolítica. Em camundongos, as subpopulações de células NK são definidas segundo a expressão das moléculas CD27 e CD11b, sendo que a maturidade destas células está associada à presença de CD11b em sua superfície. A subpopulação $CD11b^{high} CD27^{high}$ está relacionada à maior propriedade efetora, por secretar grandes quantidades de citocinas após estímulo e possuir maior capacidade citotóxica, além de expressar CXCR3. Por outro lado, células NK de fenótipo $CD11b^{high} CD27^{low}$ possuem maior limiar de ativação, expressam os receptores inibitórios Ly49 e KLRG1 e constituem o estágio mais maduro destas células (Hayakawa *et al.*, 2006; Grégoire

et al., 2007). Dessa forma, as células NK independente da espécie desempenham funções imunes específicas de acordo com o grau de maturação em que se encontram, sendo que dependendo do microambiente pode ocorrer predominância de uma ou outra subpopulação específica.

Na resposta imune da TB, as células NK têm sido relacionadas a uma importante fonte de citocinas, principalmente de IFN- γ ; mas também podem secretar IL-5 e IL-13, além de citocinas de perfil regulatório como IL-10. Possuem papel de maior destaque em infecções agudas virais, no entanto, essas células têm ganhado importância no cenário de doenças crônicas e bacterianas como a TB (Culley, 2009). Junquera-Kipnis *et al.*, demonstraram em 2003, que camundongos infectados com *Mtb* apresentam aumento na população de células NK no pulmão nas três primeiras semanas de infecção, sendo que estas células apresentavam expressão aumentada de marcadores de ativação, IFN- γ e perforina após estimulação *in vitro*. Em humanos, foi observada grande quantidade de células NK produtoras de IFN- γ no líquido pleural de pacientes com TB (Schierloh *et al.*, 2005); e em estudos *in vitro*, estas células demonstraram capacidade efetora na morte de células infectadas por *Mtb* (Brill *et al.*, 2001).

Em condição de homeostase, as células do epitélio brônquico produzem espontaneamente IL-15, capaz de promover a sobrevivência das células NK (Ge *et al.*, 2004). Como as vias aéreas superiores e inferiores estão constantemente expostas a antígenos ambientais e a organismos comensais, existem mecanismos envolvidos na tolerância a esses fatores. Um exemplo disso é a produção de IL-10, TGF- β e prostaglandinas por macrófagos alveolares, que contribuem para o alto limiar de indução de inflamação no pulmão (Wissinger *et al.*, 2009). Dessa forma, a ativação das células NK no pulmão vai depender do balanço entre os fatores pró-inflamatórios e regulatórios. Na infecção por *Mtb*, as células NK podem ser ativadas indiretamente pela ação da citocinas IL-12, IL-18 e IFN- α/β secretados pelas células dendríticas ou ainda através do reconhecimento de ligantes específicos via seus receptores de ativação (Culley, 2009). O receptor de ativação NKp44 possui a capacidade de se ligar diretamente a um componente da parede celular micobacteriana (Esin *et al.*, 2008), enquanto os outros receptores como o NKp46 e o NKG2D geralmente reconhecem moléculas que passam a ser expressas na superfície das células infectadas como a vimentina e o ULBP-1, respectivamente (Vankayalapati *et al.*, 2005; Garg *et al.*, 2006).

Após serem ativadas, as células NK exercem suas funções efectoras, sendo as duas principais: a produção de IFN- γ e citotoxicidade celular mediada pela liberação do conteúdo dos seus grânulos (perforinas e granzimas) ou por apoptose (Vivier *et al.*, 2008). Além disso,

estas células também estão envolvidas na maturação e modulação de células dendríticas (Jiao *et al.*, 2011), células T, B e endoteliais. Em humanos e camundongos, as células NK podem causar a lise de células dendríticas imaturas, o que pode limitar, por exemplo, a eficácia de vacinas baseadas nesta população celular (Hayakawa *et al.*, 2004). Por outro lado, a morte destas células pode favorecer o mecanismo de apresentação cruzada de antígenos, propiciando o desenvolvimento da imunidade adaptativa (Vivier *et al.*, 2008).

O papel das células NK durante a patogênese da TB ainda é controverso, pois alguns autores sugerem que sua função seja redundante após a observação de que camundongos deficientes das mesmas não apresentavam alteração significativa da carga bacilar no pulmão (Junqueira-Kipnis *et al.*, 2003). No entanto, na ausência da imunidade adaptativa, a atividade das células NK foi capaz de controlar o crescimento bacteriano e limitar o acúmulo de granulócitos nos sítios lesionados em modelo animal (Feng *et al.*, 2006).

Além das células NK serem descritas como linha de defesa inicial contra um microrganismo, auxiliando na resolução da infecção antes mesmo do desenvolvimento da imunidade adaptativa, recentemente tem sido relatada sua participação numa segunda exposição aos antígenos, atuando como células de memória (Biron, 2010; Paust *et al.*, 2010). Em modelo de infecção viral, observaram-se células NK com fenótipo de memória e que possuíam a capacidade de rapidamente produzirem citocinas e degranular durante a reativação da infecção, e conferiram proteção a animais que receberam estas células por transferência adotiva (Sun *et al.*, 2009). Portanto, esta observação constitui mais uma evidência da importância do estudo das células NK na imunidade geral da TB e na resposta à imunização contra a doença.

1.3.2. Células T *natural killer*

Existe também um tipo celular peculiar que participa na resposta imune da TB denominada células NKT, devido à co-expressão do receptor de célula T (TCR) e receptores de superfície das células NK. Constitui uma pequena população de linfócitos T derivados do timo, restrita à apresentação antigênica via a molécula CD1 e subdivide-se em dois tipos: tipo 1 ou iNKT, por expressarem a cadeia α do TCR invariante; e tipo 2, que possui maior repertório de TCR. Estas células fazem parte da imunidade inata por efetuarem morte rápida e

produzirem citocinas sem a necessidade de extensiva diferenciação e divisão celular (Bendelac *et al.*, 2007; Berzins *et al.*, 2011).

As células NKT geralmente reconhecem antígenos de origem lipídica apresentados via CD1 expressos na superfície das células apresentadoras de antígenos. Em humanos e na maioria dos mamíferos, existem 5 isoformas da proteína CD1 (CD1a, b, c, d, e); enquanto camundongos possuem somente o CD1d. Genes CD1 são encontrados fora da região do MHC, possuem poucos alelos e não são altamente polimórficos como o MHC. Além disso, o sulco da molécula de CD1 é mais hidrofóbico, sendo um dos fatores que explica a natureza lipídica dos antígenos apresentados (Moody *et al.*, 2005). Em camundongos, as células NKT são definidas como NK1.1⁺ CD3⁺ ou CD49b⁺ CD3⁺ e estão presentes em maior quantidade no fígado, onde constituem cerca de 30% dos linfócitos T totais e auxiliam na resposta imune local (Bendelac *et al.*, 2007; Grégoire *et al.*, 2007). Já em humanos, estas células caracterizam-se pela expressão dos receptores CD56 e/ou CD161 e CD3, sendo encontradas em maior proporção no fígado (~ 1% dos linfócitos) e omento (~10% dos linfócitos) (Berzins *et al.*, 2011).

A função das células NKT tem sido amplamente estudada a partir do uso de um glicosfingolipídio sintético denominado α -galactosilceramida (α -GalCer) e que é capaz de estimular diretamente essas células. Sob estímulo dessa molécula, as células NKT levam à ativação da citólise e produção de IFN- γ pelas células NK, além de aumentar as propriedades co-estimuladoras e de apresentação antigênica das células dendríticas (Carnaud *et al.*, 1999; Fujii *et al.*, 2003). As próprias células NKT são produtoras de IFN- γ e exercem atividade citotóxica via perforina, CD95-CD95L e/ou TNF- α (Berzins *et al.*, 2011). No entanto, merecem destaque pela habilidade em secretarem grandes quantidades de IL-4 e outras citocinas relacionadas ao padrão Th2 como IL-13 (Yoshimoto & Paul, 1994).

Na resposta imune da TB, existem vários trabalhos demonstrando a participação das células NKT, sendo que a primeira evidência da proteção mediada por estas células em modelo de infecção *in vivo* foi relatada por Sada-Ovalle *et al.* em 2008. Neste estudo, viu-se que células iNKT são capazes de controlar o crescimento bacteriano após serem estimuladas por macrófagos infectados que expressavam CD1d, além das citocinas IL-12 e IL-18. E que a transferência de células iNKT para animais infectados com Mtb via aerosol foi capaz de reduzir significativamente a carga bacilar no pulmão. Outro estudo que demonstrou a importância das células NKT na resposta imune contra Mtb foi conduzido por Venkataswamy *et al.* em 2009, onde a incorporação da molécula α -GalCer na vacina BCG aumentou sua

eficácia, por meio da modulação da maturação de células dendríticas e aumento da resposta associada aos linfócitos T CD8⁺.

Em humanos, verificou-se associação entre o maior número de células NKT em pacientes que apresentaram resposta rápida ao tratamento da TB (Veenstra *et al.*, 2006) e existem evidências de que a deficiência de células NKT pode predispor os pacientes infectados a desenvolverem TB ativa (Sutherland *et al.*, 2009). Todos esses dados em conjunto destacam a importância do estudo das células NKT na resposta imune da TB e o seu potencial emprego no melhoramento de estratégias profiláticas e também terapêuticas.

1.3.3. Células T $\gamma\delta$

No geral, as células classicamente denominadas da imunidade inata estão envolvidas na indução da resposta imune adaptativa de duas maneiras: internalizam os patógenos e as células em apoptose, realizam seu processamento, e apresentam os antígenos via MHC para as células T $\alpha\beta$ convencionais; e também, integram sinais de perigo e inflamatórios, traduzindo-os em estímulo capaz de promover a polarização funcional na resposta das células B e T (Banchereau & Steinman, 1998). Nesse sentido, além das células NK e NKT, outra célula T não convencional, que possui características das imunidades inata e adaptativa e que exerce importante papel na TB é a célula T $\gamma\delta$.

Os linfócitos T $\gamma\delta$ foram descobertos em 1987 e são assim denominados por expressarem as cadeias γ e δ do TCR em sua superfície (Brenner *et al.*, 1987; Borst *et al.*, 1987). Possuem a capacidade de reconhecerem antígenos não protéicos e moléculas induzidas pelo estresse via TCR, TLR e receptores de células NK como o NKG2D. Na maioria das vezes, a ativação dessas células ocorre de forma indireta através da secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas, sendo sua rápida ativação decorrente do seu fenótipo pré-ativado. Dentre as funções efetoras descritas para as células T $\gamma\delta$ estão: morte de células infectadas via CD95-CD95L, TRAIL e perforinas e granzimas; produção de substâncias líticas e/ou bacteriostáticas como granulísina e defensinas; e síntese de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-5, IL-13, TGF- β , IL-10) (Bonneville *et al.*, 2010).

Em camundongos, as células T $\gamma\delta$ constituem a primeira linhagem de linfócitos T a aparecerem no timo e depois passam a predominar no epitélio. De acordo com a expressão

das cadeias γ e δ do TCR, estas células são divididas em subtipos, os quais possuem funções especializadas diferenciadas dentro de cada espécie. Dentre as células T $\gamma\delta$ murinas, são encontrados os seguintes subtipos: V γ 3V δ 1 predominante na epiderme, V γ 2V δ 5/6 no pulmão, V γ 4V δ 1 no útero e vagina, V γ 5V δ 2/4/5/6 no epitélio intestinal; e as células T $\gamma\delta$ circulantes expressam principalmente as cadeias V γ 1V δ 5/6 ou V γ 2V δ 5 (Carding & Egan, 2002).

Em 2009, Ribot *et al.* descreveram em seu trabalho subpopulações funcionalmente distintas de células T $\gamma\delta$ murinas, baseadas na expressão do receptor CD27, membro da família do receptor TNF, que se liga ao CD70, uma glicoproteína transmembrana relacionada ao TNF. As células T $\gamma\delta$ CD27⁺ foram descritas por expressarem genes associados à resposta imune de perfil Th1, principalmente a citocina IFN- γ , assim como o fator de transcrição T-bet. Por outro lado, as células T $\gamma\delta$ CD27⁻ foram associadas ao perfil Th17, com predominância da produção de IL-17 e expressão de genes relacionados, incluindo o fator de transcrição Ror γ t.

Em humanos e outros primatas, as células T $\gamma\delta$ representam uma pequena porcentagem dos linfócitos T totais presente no sangue periférico, cerca de 1 a 5% (Haas & Tonegawa, 1992). O subtipo V γ 9/V δ 2 (também denominado V γ 2/V δ 2) predomina entre os linfócitos T $\gamma\delta$ encontrados no sangue periférico de humanos (80-90% dos linfócitos T $\gamma\delta$ totais) e caracteriza-se por reconhecer ligantes não peptídicos como os fosfoésteres naturais derivados de micobactéria (fosfoantígenos) sem apresentação via MHC (Morita *et al.*, 2001). Esse subtipo, quando estimulado por antígenos aumenta a expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC de classes I e II em sua superfície; além de demonstrar habilidade de fagocitose, processamento antigênico e ativação das células B e T; características condizentes com o fenótipo de células apresentadoras de antígenos. Outras funções que também foram associadas aos linfócitos T $\gamma\delta$, no geral, incluem papel regulatório e interação com células B para troca de isotipo e formação dos centros germinativos (Moser & Eberl, 2011).

Dentre as citocinas produzidas pelos linfócitos T $\gamma\delta$, a que tem sido mais estudada nos últimos tempos é a IL-17. Isto porque as células T $\gamma\delta$ foram consideradas fonte primária desta citocina e na infecção por Mtb, estas células são a principal fonte de IL-17 (Lockhart *et al.*, 2006). Os primeiros estudos realizados com camundongos deficientes de T $\gamma\delta$ demonstraram aumento no crescimento bacteriano destes animais (Ladel *et al.*, 1995). No entanto, posteriormente essa observação foi atribuída ao modelo de infecção com alta carga bacilar e que nessa situação, as células T $\gamma\delta$ teriam importância. Em 1997, D'Souza *et al.*, observaram

que a principal consequência da ausência dessa população celular em animais com TB era a formação de granulomas maiores e mais desorganizados, que pode ser relacionado também à diminuição de IL-17, conhecida por atuar no recrutamento de neutrófilos e monócitos em geral para compor a estrutura granulomatosa.

Uma das primeiras evidências de que *Mtb* é capaz de ativar as células T $\gamma\delta$, foi demonstrada nos estudos de Kabelitz *et al.* em 1991, em que essa população celular proliferava dentre as células presentes no sangue periférico em resposta a uma preparação de micobactérias mortas. De forma similar ao que acontece com as células NK encontradas no pulmão, as células T $\gamma\delta$ nesse local também possuem alto limiar de ativação, sendo que sua função é inibida principalmente pela ação dos macrófagos alveolares. No entanto, após infecção por *Mtb* e infecção dos macrófagos, estas células passam a expressar citocinas como IL-15 e moléculas co-estimulatórias, propiciando a subsequente ativação dos linfócitos T $\gamma\delta$ (Meraviglia *et al.*, 2011). Uma vez ativados por *Mtb*, estes linfócitos são descritos por atuarem via secreção de citocinas como IFN- γ , com nível de expressão similar a dos linfócitos T CD4⁺ (Gioia *et al.*, 2003); assim como via suas funções citotóxicas, em que já foi relatado que estas células são capazes de reduzir a viabilidade da micobactéria intra e extracelular pelos mecanismos dependentes de granulicina e perforina (Dieli *et al.*, 2001).

Recentemente tem sido descrita outra função associada aos linfócitos T $\gamma\delta$, a partir de observações de que células dendríticas infectadas com *Mtb* e co-cultivadas com as células T V γ 9V δ 2 aumentaram a expressão de moléculas relacionadas ao fenótipo maduro como CD80 e CD40 (Meraviglia *et al.*, 2010). Este achado pode ser interessante ao demonstrar a existência de mecanismos mediados pelas células T $\gamma\delta$ que auxiliam o sistema imune a “driblar” as estratégias de sobrevivência do microrganismo; além de exemplificar a interação entre os diferentes compartimentos do sistema imunológico, o que pode propiciar que uma pequena população, como a dos linfócitos T $\gamma\delta$, exerça seus efeitos de forma sistêmica (Meraviglia *et al.*, 2011).

Em estudos com macacos infectados com *Mtb*, foi demonstrado que os linfócitos T $\gamma\delta$ estavam envolvidos no desenvolvimento da resposta de memória à micobactéria, visto que numa segunda exposição ao patógeno, estas células demonstraram rápida expansão, que foi associada à redução da bacteremia e efeito protetor na TB. Também tem sido estudada a incorporação de antígenos conhecidos por estimularem os linfócitos T $\gamma\delta$, como os fosfoantígenos, em algumas formulações vacinais testadas em primatas não humanos. Resultados preliminares demonstraram a montagem de resposta imune diferenciada de células

T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, abrindo novas perspectivas da importância do estudo e possível aplicação dos linfócitos T $\gamma\delta$ como alvo em imunoterapias para TB (Casetti & Martino, 2008).

1.4. Estratégias profiláticas e terapêuticas na TB

A única vacina licenciada para uso clínico na TB é a vacina BCG (*Bacillus Calmette Guérin*), desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin a partir da atenuação de um isolado de *M. bovis*. Esta vacina foi primeiramente utilizada em humanos em 1921 e desde 1974 faz parte do Programa de Imunização da Organização Mundial da Saúde. Em países com alta incidência da TB, a BCG é administrada logo após o nascimento e dentre as vantagens de sua administração estão: o baixo custo de produção, a ocorrência de pouco ou nenhum efeito adverso, e alta eficácia na proteção de crianças contra as formas graves da doença. Por outro lado, a eficácia dessa vacina varia em adultos numa taxa de 0 a 80%, a imunidade por ela induzida diminui em um período de 10 a 15 anos após a aplicação, além de apresentar risco à saúde de indivíduos imunocomprometidos. Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de vacinas que sejam mais eficazes na profilaxia da TB, que em conjunto com a rápida detecção de novos casos e o efetivo tratamento dos mesmos podem auxiliar no controle da doença (Rowland & McShane, 2011).

A maioria das vacinas candidatas existentes para serem utilizadas na TB baseiam-se na estimulação da resposta imune de perfil Th1 e como consequência ativam a função microbicida de macrófagos, assim como outros mecanismos associados à imunidade protetora na TB. As vacinas em estudo podem ser divididas nas seguintes categorias: vacinas vivas atenuadas de micobactérias, geralmente são modificações da BCG ou de outras micobactérias homólogas; vacinas de subunidade, baseadas em antígenos específicos reconhecidos pelas células T de pacientes; e também existem as vacinas de DNA nu ou baseadas em vetores virais. Uma das dificuldades na pesquisa de novas vacinas para TB está na realização de ensaios clínicos que passam a considerar a diversidade populacional em termos genéticos, culturais e ambientais, o que requer a sua realização em diferentes regiões do mundo. Além disso, na falta de um biomarcador específico relacionado à proteção na TB, a maioria dos ensaios clínicos objetivam o estabelecimento da eficácia das vacinas, o que requer longo prazo de acompanhamento, assim como sistemas de vigilância eficientes no monitoramento

de dados relacionados, por exemplo, à mortalidade e morbidade dos pacientes (Kaufmann *et al.*, 2010).

Apesar da TB ser uma doença curável, estima-se que um indivíduo com TB ativa infecte no mínimo mais três pessoas antes de receber diagnóstico e tratamento adequados (Beresford & Sadoff, 2010). O regime quimioterápico padrão empregado no tratamento de pacientes recentemente diagnosticados com TB consiste na administração de um coquetel de drogas composto por: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol durante dois meses. Nos quatro meses seguintes, o tratamento é feito somente com as drogas isoniazida e rifampicina (World Health Organization, 2009).

O complexo esquema terapêutico utilizado atualmente no tratamento da TB causa uma série de efeitos colaterais que contribuem para o abandono da terapia, propiciando a reemergência da doença e o aparecimento de casos MDR e XDR. Devido a esses fatores, há a necessidade de se dedicar ao estudo de terapias que melhorem a qualidade de vida dos pacientes, de menor duração e que sejam mais eficazes na prevenção de uma possível reativação da doença (Ma *et al.*, 2010).

Alguns pesquisadores sugerem que as novas drogas a serem desenvolvidas para tratamento da TB possuam atividades: bactericida e esterilizante. A atividade bactericida refere-se à propriedade de provocar a morte rápida do microrganismo metabolicamente ativo, prevenindo em certo grau a transmissão da doença. Enquanto a atividade esterilizante é a habilidade da droga em provocar a morte dos microrganismos viáveis, e possuir potencial em diminuir o tempo de tratamento. A isoniazida é descrita por apresentar excelente atividade bactericida, enquanto a rifampicina possui boa capacidade esterilizante. Apesar do atual regime de tratamento consistir na administração dessas duas drogas juntamente com outras já citadas, ainda existem casos de reincidência da doença, evidenciando a necessidade de melhor entendimento dos mecanismos relacionados à patogenia do microrganismo, assim como o emprego de novas drogas terapêuticas (Grosset, 1981 e 1990; Mitchison, 1985; Ma *et al.*, 2010).

Nesse sentido, várias estratégias terapêuticas têm sido estudadas com relação à possibilidade do seu uso no tratamento da TB. Elas objetivam, em sua maioria, a modulação do sistema imune para aumentar a resposta protetora contra a micobactéria (Roy *et al.*, 2007). O pulmão, sítio primário da infecção, caracteriza-se como um órgão frequentemente exposto a diversos antígenos ambientais, o que explica o alto limiar de ativação das células do sistema imune ali presentes. Portanto, drogas que sejam utilizadas para amplificar a resposta imune

local juntamente com drogas de ações bactericida e esterilizantes tornam-se estratégias interessantes a serem aplicadas no tratamento da TB (Beresford & Sadoff, 2010).

1.5. Vacina DNAhsp65 e suas implicações na TB

O Laboratório de Vacinas Gênicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP estuda há mais de dez anos a vacina gênica DNAhsp65, conhecida por seus efeitos profiláticos e terapêuticos em modelos de tuberculose (Tascon *et al.*, 1996; Lowrie *et al.*, 1999). Esta vacina possui em sua estrutura o gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (HSP65) de *M. leprae*. A proteína homóloga de Mtb juntamente com a HSP70 são as duas proteínas mais expressas pelo bacilo no interior do macrófago (Lee & Horwitz, 1995). Além disso, 10-20% das células T de camundongos infectados com Mtb são específicas para HSP65 (Kaufmann *et al.*, 1987; Kaufmann, 1992).

As proteínas de choque térmico possuem funções peculiares inerentes a sua estrutura que as caracterizam como moléculas essenciais para a sobrevivência celular. As HSPs atuam como chaperonas, auxiliando no dobramento, desdobramento, degradação e prevenção da agregação de proteínas e auxiliam na montagem de complexos formados por subunidades. Também possuem atividade de ATPase e têm sido descritas como envolvidas na indução da resposta imune, auxiliando no processo de apresentação antigênica e maturação das células dendríticas (Feige & Mollenhauer, 1992; Kaufmann, 1992). Em 2002, Portaro *et al.* reportaram a atividade da HSP65 de *M. leprae* como carreadora de peptídeos associada à função proteolítica. Além disso, estudos recentes do grupo demonstraram a interação da HSP65 com TLR4 e a sinalização via as moléculas adaptadoras TRIF e MyD88 para indução da maturação e diferenciação de células dendríticas, as quais foram estimuladas a secretar citocinas, aumentaram a expressão de moléculas co-estimulatórias e ativaram linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos (Souza, 2011).

Em 1997, Lowrie e colaboradores demonstraram alguns dos mecanismos envolvidos na proteção de animais vacinados com DNAhsp65 e posteriormente infectados com Mtb. Neste estudo, foi detectada a presença de células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas para HSP65 no baço de animais vacinados com DNAhsp65, sendo que a maioria desses clones de células T eram produtores de IFN- γ e possuíam atividade citotóxica. Além disso, foi demonstrado que a imunidade protetora observada nos animais vacinados com DNAhsp65 era capaz de ser

transferida para animais não vacinados por meio da administração de células T específicas para HSP65 provenientes do baço de animais anteriormente imunizados com a vacina. Em seguida, Bonato *et al.*, 1998, descreveram a predominância de células T de fenótipo CD44^{low} produtoras de IL-4 em animais somente infectados com Mtb, enquanto a proteção observada nos animais imunizados com a vacina DNAhsp65 estava associada à maior quantidade de células T CD8⁺ de fenótipo CD44^{high} e produtoras de IFN- γ .

Além dos efeitos profiláticos observados em animais imunizados com DNAhsp65 e posteriormente infectados com Mtb; em 1999, Lowrie e colaboradores, demonstraram que animais infectados com Mtb e submetidos ao tratamento com 4 doses da vacina DNAhsp65 apresentaram diminuição da carga bacilar no pulmão e baço em até 5 meses após a primeira dose da vacina. E a resposta imune relacionada a esse efeito incluía o desenvolvimento de células T de perfil Th1 no linfonodo dos animais vacinados. Em 2004, Bonato *et al.*, realizaram estudo com o intuito de ampliar o conhecimento existente sobre os mecanismos imunes modulados pela vacina DNAhsp65 no protocolo de imunoterapia experimental. Nesse sentido, foi demonstrado aumento na produção de IFN- γ e TNF- α no pulmão dos animais vacinados com DNAhsp65 em relação aos animais somente infectados, além do aumento na expressão das moléculas CD28, CD18, CD95 e CD95L em células T CD8⁺; em contrapartida, o número de macrófagos e células dendríticas no pulmão dos animais permaneceu inalterado após administração da vacina.

Em 2005, no modelo de imunoterapia da TB com DNAhsp65, foi realizada a associação desta vacina com as drogas convencionais utilizadas no tratamento da TB (isoniazida e pirazinamida) e verificou-se efeito adjuvante desta associação, diminuindo o tempo de tratamento dos animais, além de ter demonstrado eficácia no tratamento de animais infectados com cepas MDR. Nesse modelo, a atividade terapêutica da vacina DNAhsp65 sozinha ou em combinação às drogas foi associada, dentre outros fatores, à presença de células T de memória de fenótipo CD44^{high} CD62L^{low} no linfonodo dos animais em até 6 meses após o início do tratamento. Além disso, observou-se que na associação DNAhsp65-Drogas havia predominância de linfócitos T produtores de IFN- γ e de caráter citotóxico no linfonodo dos animais. Por outro lado, as células T antígeno específicas advindas de animais somente infectados ou tratados somente com as drogas apresentavam fenótipo Th2, relacionado à maior produção da citocina IL-4 por estas células. Ainda neste trabalho, verificou-se que macrófagos provenientes do lavado broncoalveolar de animais infectados com Mtb e posteriormente tratados com DNAhsp65 ou com a associação DNAhsp65-Drogas

apresentavam altos níveis de IL-12 e moléculas relacionadas ao MHC de classe I e II, ao contrário daqueles macrófagos obtidos dos animais somente infectados ou tratados somente com as drogas; evidenciando dessa forma diferentes respostas imunes como efeito das terapias (Silva *et al.*, 2005).

Devido ao fato das HSPs serem proteínas altamente conservadas entre diferentes espécies, tanto procariontes como eucariontes (Jindal *et al.*, 1989), e sendo que a proteína HSP65 tem 65% de homologia com a sequência protéica da sua homóloga humana, foi levantada a hipótese de que o emprego da vacina DNAhsp65 poderia desencadear resposta autoimune quando administrada tanto em camundongos como em humanos. No entanto, não têm sido mostrados resultados compatíveis com essa idéia, pois, estudos realizados na profilaxia e terapia da tuberculose, em modelos murinos de artrite reumatóide, diabetes mellitus e encefalomielite experimental foram incapazes de mostrar qualquer efeito negativo na utilização da vacina DNAhsp65 nesses modelos, e pelo contrário, os animais vacinados apresentaram efeitos protetores no desenvolvimento dessas patologias (Santos-Junior *et al.*, 2005 e 2007; Silva *et al.*, 2009; Zorzella-Pezavento *et al.*, 2010; Doimo, 2010).

Além dos resultados promissores da vacina DNAhsp65 observados em modelos experimentais de TB e doenças auto-imunes, também foram demonstrados efeitos protetores em estudos utilizando modelo murino de câncer (Lukacs *et al.*, 1997) e de outras doenças infecciosas como a paracoccidiodomicose (Ribeiro *et al.*, 2010). Os efeitos protetores associados à vacina DNAhsp65 possibilitaram a realização de um ensaio clínico de fase I em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço refratários ao tratamento convencional e com expectativa de vida de 6 meses. Os resultados obtidos demonstraram a segurança da vacina gênica, por não terem sido relatados efeitos tóxicos relacionados à vacinação, além da observação de que alguns pacientes apresentaram certa melhora em seu quadro patológico, com redução considerável da massa tumoral (Michaluart *et al.*, 2008; Victora *et al.*, 2009).

Uma ferramenta bastante útil que tem sido frequentemente utilizada no estudo da resposta imune em doenças, assim como na procura de biomarcadores que possam indicar o sucesso de um tratamento é a análise do transcriptoma. Nesse sentido, em 2009, Zárate-Bladés *et al.*, demonstraram em camundongos infectados com Mtb e tratados com a vacina DNAhsp65, a modulação de fatores inflamatórios e outros produtos protéicos envolvidos em diferentes mecanismos imunes como a inibição de citocinas relacionadas ao padrão Th2 e a regulação da expressão de genes envolvidos na intensidade da inflamação como IFN- γ , IL-17, linfotóxina- α , TNF- α , IL-6, TGF- β , iNOS e Foxp3. Nessa mesma linha, foi desenvolvido

recentemente em nosso laboratório ampla análise do transcriptoma a partir de amostras de pulmão de animais infectados com *Mtb* e tratados com a vacina DNAhsp65, ou com as drogas RIF e INH, ou ainda com as drogas em associação à vacina (Rodrigues, 2011). Estes trabalhos em conjunto demonstram que os efeitos imunoterapêuticos desencadeados pela vacina DNAhsp65 envolvem grande número de processos e tipos celulares.

No trabalho de Rodrigues (2011) foi demonstrado que, de modo geral, as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, macrófagos e células dendríticas estão diminuídas no pulmão dos animais dos grupos infectados e tratados com as drogas ou com a associação terapêutica em comparação tanto ao grupo salina quanto ao grupo tratado com DNAhsp65. Já as populações de neutrófilos e mastócitos tendem a serem maiores no grupo tratado com a associação terapêutica em relação aos demais. Além disso, foram encontradas evidências do envolvimento de mecanismos imunes que podem ser associados a funções de células da imunidade inata como os linfócitos NK e NKT, que juntamente com observações anteriores do possível envolvimento de células T $\gamma\delta$ (Silva *et al.*, 1994), assim como de células NK (Dos Santos, 2001) na resposta imune desencadeada pela vacina DNAhsp65, torna necessário o estudo mais detalhado da participação destas células na resposta imune induzida pela vacina DNAhsp65 no modelo experimental da TB.

2.Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da imunoterapia com a vacina gênica DNAhsp65 e do tratamento com as drogas rifampicina e isoniazida, ou de ambas as terapias, sobre as células *natural killer*, T *natural killer* e T $\gamma\delta$ em modelo murino de tuberculose.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a modulação de células NK, NKT e T $\gamma\delta$ em termos quantitativos no pulmão de animais somente infectados com Mtb.
- Investigar se as terapias propostas alteram as quantidades relativa e absoluta das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ no pulmão e linfonodo dos animais previamente infectados com Mtb, assim como de suas respectivas subpopulações celulares e a expressão de moléculas relacionadas à suas funções específicas.
- Relacionar as mudanças observadas quanto às diferentes populações celulares com os efeitos protetores anti-TB das terapias empregadas.

3. Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de Ribeirão Preto. Os camundongos durante todo protocolo experimental, foram mantidos em isoladores de animais, com temperatura, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados, com livre acesso a água e ração. Animais infectados com Mtb foram mantidos em sala de Biossegurança Nível 3.

Todos os procedimentos com animais, assim como os protocolos experimentais deste trabalho, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – USP (Processo n° 068/2009).

3.2. Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em diferentes grupos experimentais, com no mínimo três animais por grupo, em cada experimento:

- controle (não infectado e não tratado);
- infectado (somente infectado com Mtb);
- salina (infectado com Mtb e que recebeu salina intramuscular e água por gavagem)
- vetor (infectado com Mtb e tratado com o plasmídeo pVAX1);
- DNAhsp65 (infectado com Mtb e tratado com pVAX1hsp65);
- drogas (infectado com Mtb e tratado com as drogas Rifampicina e Isoniazida);
- DNAhsp65-drogas (infectado com Mtb e tratado com pVAX1-hsp65 em associação com as drogas Rifampicina e Isoniazida).

No dia 0 do protocolo experimental (Figura 1), os animais foram infectados com 1×10^5 bacilos de Mtb via intratraqueal. Nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção, foi promovida a eutanásia dos animais dos grupos controle e infectado para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão, baço e fígado e realização da citometria de fluxo a

partir das células totais obtidas do pulmão (Figura 1a). No dia 30, iniciou-se a imunoterapia dos animais com a vacina DNAhsp65 ou apenas o vetor plasmideal, administrado em 4 doses; e o tratamento com as drogas rifampicina e isoniazida administradas diariamente até o dia 60 após a infecção. Dez dias após a última dose da vacina e do tratamento com as drogas (dia 70), promoveu-se a eutanásia dos animais dos diferentes grupos experimentais para realização das análises subseqüentes (Figura 1b).

Figura 1. Delineamento experimental utilizado no estudo da função das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ no modelo de tuberculose experimental murina.

3.3. Infecção dos animais com Mtb

3.3.1. Preparo do inóculo de Mtb

O inóculo utilizado na infecção dos animais foi preparado a partir da cepa virulenta de Mtb H37Rv – ATCC-27294, cultivada em 2,5 mL de meio líquido 7H9 (Difco) enriquecido com 10% de OADC, a 37°C durante 10 dias. A cultura foi agitada em todos os dias de incubação; e após este período, foi centrifugada a 500 x g por 20 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi ressuscitado em 1mL de PBS estéril, transferido para um tubo contendo pérolas de vidro e agitado vigorosamente com auxílio de um vórtex até adquirir aspecto homogêneo. A suspensão foi acertada para 1×10^7 bacilos/mL, em comparação com a escala de McFarland nº1, e posteriormente diluída para 1×10^6 bacilos/mL.

Para determinar a viabilidade da cultura de micobactéria foi empregado o método descrito por McDonough & Kress (1995), no qual 100 µL da suspensão de micobactérias foram corados com 100 µL de diacetato de fluoresceína (2µg/mL) (Sigma, EUA) e 100 µL de brometo de etídio (Gibco BRL) (0,5 mg/mL). A análise da viabilidade foi feita em microscópio de fluorescência (Leica). As micobactérias viáveis são capazes de metabolizar o diacetato de fluoresceína produzindo fluoresceína, e por isso apresentam coloração esverdeada; as não viáveis incorporam o brometo de etídio apresentando coloração alaranjada. Além disso, foi realizada a coloração de Ziehl-Nielsen para observação dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em microscópio ótico.

A quantidade utilizada do inóculo também foi checada após plaqueamento da suspensão diluída de micobactérias em meio de cultura 7H11. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 28 dias e após esse período, foi realizada a contagem das UFC.

3.3.2. Infecção experimental

Os animais submetidos à infecção experimental com Mtb foram previamente anestesiados com 100 µL de solução de cloridrato de cetamina 10% (100 mg/kg) e xilazina 2% (20 mg/kg) (Agener União) por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram

infectados por via intratraqueal com a injeção de 100 µL da suspensão de Mtb H37Rv a 1×10^6 bacilos/mL.

3.4. Tratamento dos animais com a vacina DNAhsp65 e/ou com as drogas rifampicina e isoniazida

3.4.1. Obtenção da vacina gênica DNAhsp65

A vacina gênica DNAhsp65 caracteriza-se pela presença de um gene de 3000 pares de bases, que codifica a proteína Hsp65 de *M. leprae*, inseridos no vetor pVAX1 (Invitrogen, EUA). O protocolo de obtenção da vacina foi realizado pela especialista de laboratório Ana Paula Masson como descrito abaixo.

Os plasmídeos, contendo o inserto hsp65 (pVAX1hsp65) ou não (pVAX1), foram purificados por cromatografia de troca iônica através do QIAGEN Giga Plasmid Purification Kit (Qiagen, EUA). Para isso, uma colônia de bactéria *E. coli* DH5α, transformada com os plasmídeos, foi retirada de uma placa contendo meio LB Agar (Sigma, EUA) e canamicina na concentração de 50 µg/mL; e inoculada em 5 mL de meio LB BROTH BASE 24 (Gibco BRL), com canamicina (50 µg/mL). Incubou-se a cultura durante 8 horas a 37°C sob agitação vigorosa (250 rpm). Em seguida, diluiu-se a cultura inicial 500 vezes em 2,5 litros de meio LB BROTH BASE, contendo canamicina (50 µg/mL) e incubou-se a 37°C, sob agitação constante durante 16 horas. Após esse período, centrifugou-se a suspensão a 2000 x g por 15 minutos a 4°C e ressuspendeu-se o precipitado em 125 mL de tampão P1 (Tris-HCl a 50 mM pH 8,0; EDTA a 10 mM e RNase a 100 µg/mL). A seguir, adicionou-se 125 mL do tampão P2 (NaOH a 200 mM, SDS a 1%) e após 5 minutos, acrescentou-se 125 mL do tampão P3 (acetato de potássio a 3,0 M - pH 5,5). O material foi filtrado e mantido no gelo por 30 minutos após adição de tampão para remoção de endotoxinas. Logo depois, aplicou-se o filtrado em resina da QIAGEN previamente equilibrada com tampão QBT (NaCl a 750 mM, MOPS a 50 mM - pH 7,0, etanol 15% e Triton X- 100 a 0,15%). A resina foi lavada com 600 mL de tampão QC (NaCl a 1,25 M: MOPS a 50 mM pH 7,0: etanol a 15%) e o DNA eluído com 100 mL de tampão QN. O DNA eluído foi precipitado com isopropanol absoluto, centrifugado a 15 000 xg, por 30 minutos a 4°C, lavado com etanol a 70% e centrifugado

novamente a 15 000 xg por 10 minutos a 4°C. Por fim, o sedimento foi ressuspenso em cerca de 1,0 mL de água estéril livre de endotoxinas.

Os plasmídeos purificados foram quantificados por espectrofotometria através do aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, EUA). Além disso, a integridade dos plasmídeos foi verificada através da digestão dos mesmos com a enzima de restrição BamH I (GIBCO, EUA) e posterior análise em gel de agarose 1%. Para mensuração de endotoxinas, empregou-se o teste cromogênico do lisado de amebócito de *Limulus polyphemus* (LAL) utilizando o *QCL-100 LAL kit* (Cambrex).

3.4.2. Drogas rifampicina e isoniazida

Os fármacos utilizados no tratamento dos animais dos grupos drogas e DNAhsp65-drogas foram: rifampicina (Sigma - Aldrich) na dose de 20 mg/kg e isoniazida (Acros Organics) a 25 mg/kg, diluídas em água estéril, sendo administradas em um volume total de 300 µL, via gavagem, por animal.

3.4.3. Protocolo de imunoterapia e tratamento dos animais

No dia 30 deu-se início ao protocolo de imunização dos animais com a vacina gênica DNAhsp65 e tratamento com as drogas rifampicina e isoniazida. Os animais foram imunizados, por via intramuscular (músculo quadríceps direito e esquerdo) com 100 µg do plasmídeo pVAX1 (grupo vetor) ou 100 µg de pVAX1hsp65 (grupos DNAhsp65 e DNAhsp65-drogas). Foram administradas quatro doses num intervalo de 10 dias entre cada uma, totalizando 400 µg de DNA por animal. A solução contendo o DNA para imunização foi diluída em salina isotônica apirogênica (Isofarma) e acrescida de sacarose na concentração final de 25%. Já as drogas RIF e INH foram administradas diariamente através de gavagem durante 30 dias (grupos drogas e DNAhsp65-drogas). Os animais do grupo salina receberam 4 doses de salina 0,9% intramuscular e água por gavagem no mesmo período das terapias. Dez

dias após a última dose da vacina (dia 70), promoveu-se a eutanásia dos animais para análise dos resultados.

3.5. Avaliação dos efeitos da imunoterapia e tratamento dos animais

Inicialmente antes da avaliação da resposta imunológica induzida pela imunoterapia com a vacina DNAhsp65 e do resultado do tratamento com as drogas; promoveu-se a eutanásia dos animais dos grupos controle e infectado, por deslocamento da coluna cervical, para análise das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ no pulmão e contagem de UFC no pulmão, baço e fígado nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção. Esta análise inicial foi realizada com o objetivo de avaliar a possível modulação dessas populações de linfócitos, com características de células inatas, na etapa inicial da infecção com alta carga bacilar. Dez dias após a última dose da vacina e do tratamento com as drogas (dia 70), promoveu-se a eutanásia dos animais dos diferentes grupos experimentais para realização das análises subsequentes.

3.5.1. Determinação da carga bacilar no pulmão, baço e fígado

Com a finalidade de verificar a proteção conferida pela imunoterapia com a vacina DNAhsp65, pelas drogas e pela associação DNAhsp65-drogas, foi realizada a determinação das UFC no pulmão, baço e fígado dos animais segundo protocolo padronizado em nosso grupo de pesquisa por Bonato *et al.* (2004), com modificações.

Dez dias após o fim dos tratamentos, promoveu-se a eutanásia dos animais dos diferentes grupos experimentais, por deslocamento da coluna cervical. A seguir, a caixa torácica dos animais foi exposta e o pulmão perfundido com aproximadamente 5 mL de solução salina 0,9% através do ventrículo esquerdo, com objetivo de eliminar das análises as células circulantes. Em seguida, o pulmão esquerdo foi infundido por via intra-traqueal com 1 mL de 70% de Tissue-Tek (O.C.T. Compound TM) e congelado a -70°C para posterior realização do protocolo de imunohistoquímica.

O pulmão direito, parte do fígado e o baço foram retirados dos animais e pesados separadamente em placas de Petri de 35 x 10 mm contendo 2 mL de RPMI-1640 para o

pulmão e o fígado, e 1mL para o baço. O pulmão foi cortado em pequenos fragmentos com auxílio de pinça e tesoura, e o fígado macerado com auxílio do êmbolo de uma seringa de 5 mL. Ambos os órgãos foram tratados com uma solução de digestão contendo 0,5 mg/mL de Liberase (Liberase Blendzyme, EUA) e 25 U/mL de Desoxirribonuclease I (Invitrogen) por 30 minutos a 37°C, 250 rpm, e o volume final acertado para 10 mL. Após a digestão, as células foram dispersas com auxílio de uma seringa de 10 mL, e uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi retirada para o protocolo de UFC. O baço foi apenas macerado envolto em organza com auxílio do êmbolo de uma seringa, para retirada de uma alíquota de 100 µL utilizada no protocolo de UFC.

Foi feita uma diluição seriada de 100, 1000, 10.000 e 100.000 vezes em PBS para o pulmão e baço; e de 10, 100, 1000 e 10.000 vezes para o fígado. As amostras diluídas foram então plaqueadas em meio de cultura sólido 7H11 e incubadas por 28 dias a 37°C com CO₂ e umidade controlados. As colônias de micobactérias foram contadas com auxílio de uma lupa. O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e o peso dos órgãos, e expresso em log₁₀ por grama de órgão.

3.5.2. Análise das populações celulares específicas

3.5.2.1. Obtenção das células totais do pulmão

As células totais do pulmão foram obtidas utilizando-se o pulmão direito dos animais, segundo protocolo descrito no item anterior (3.5.1). Após dispersão das células com auxílio da seringa de 10 mL e retirada da alíquota para a determinação de UFC, interrompeu-se a reação de digestão pela adição de 5mL de RPMI-1640 contendo 10% de SBF (soro bovino fetal). Em seguida, filtrou-se a suspensão de células em organza e centrifugou-se a 300 x g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de células ressuspense em 1 mL de tampão de lise de hemácias e incubado por 1 min. A reação de lise foi interrompida pela adição de 10 mL de solução de PBS 1X. A seguir, centrifugou-se a amostra a 300 x g, por 10 min a 4°C e ressuspendeu-se o precipitado em 1 mL de meio RPMI-1640 para contagem das células em câmara de Neubauer.

3.5.2.2. Obtenção das células totais do linfonodo

Para obtenção das células totais do linfonodo foram retirados os linfonodos cervicais, axilares e mediastínicos dos animais e colocados em placas de Petri de 35 x 10 mm contendo 1mL de RPMI-1640. Em seguida, os linfonodos foram envoltos em organza e macerados com auxílio do êmbolo de uma seringa de 5 mL. Após dispersão das células, transferiu-se o volume para um falcon de 15 mL e procedeu-se à contagem das células em câmara de Neubauer.

3.5.2.3. Avaliação das células T não convencionais por citometria de fluxo

Após contagem, as células foram separadas em tubos de 15 mL ou 1,5 mL, sendo utilizadas pelo menos 1×10^6 células por marcação. Centrifugou-se a 300 x g, por 10 min a 4°C e ressuspendeu-se em 40µL de FcBlock (obtido a partir de sobrenadante de cultura de células 2.4G2, ATCC-HB-197™) diluído 1:1 em RPMI-1640. A suspensão celular foi transferida para uma placa de 96 poços e incubada por 30 min a 4°C. Em seguida, adicionou-se 40µL da solução previamente diluída de anticorpos. Foram utilizados os seguintes anticorpos: CD3ε-APC (clone 145-2C11), CD49b-PE (clone DX5), CD49b-FITC (clone DX5), γδ-FITC (clone GL3), CD11b-PerCP-Cy™5.5 (clone M1/70) e CD27-PE (clone LG.3A10), adquiridos da BD Biosciences. A marcação foi realizada por 25 min a 4°C, no escuro. Após o tempo de incubação, adicionou-se 200 µL da solução de PBS com 2% de SBF para lavagem. Centrifugou-se a placa por 10 min a 300xg, 4°C e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em 200 µL de PBS com 1% de formaldeído e mantidas a 4°C até a aquisição. Foram adquiridos 100.000 eventos no mínimo de cada amostra no citômetro FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o software FlowJo versão 5.7.2. Todos os anticorpos foram titulados previamente para utilização da melhor diluição no experimento, sendo utilizada a diluição de 1:100 para os anticorpos CD3ε-APC, CD49b-FITC/PE e γδ-FITC; e de 1:200 para os anticorpos CD11b-PerCP-Cy™5.5 e CD27-PE. As populações celulares e suas respectivas subpopulações foram definidas segundo a combinação de anticorpos demonstradas na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Populações celulares estudadas por citometria de fluxo

População	Anticorpos
Células NK	CD3 e CD49b
Células NKT	CD3 e CD49b
Subpopulações de células NK	CD3, CD49b, CD11b e CD27
Células T $\gamma\delta$	CD3 e $\gamma\delta$
Subpopulações de células T $\gamma\delta$	CD3, $\gamma\delta$ e CD27

3.5.3. Avaliação da produção de citocinas por células específicas do pulmão

3.5.3.1. Avaliação da produção de citocinas pelas células NK e T $\gamma\delta$ por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*Real-time PCR*)

3.5.3.1.1. Separação das células NK e T $\gamma\delta$

Após obtenção das células totais do pulmão, juntou-se as células de cada grupo experimental para separação das populações celulares de interesse por meio de esferas magnéticas. As células NK foram separadas por seleção negativa utilizando-se o *NK Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA, USA). Enquanto as células T gama-delta foram separadas por seleção positiva utilizando-se o *TCR $\gamma\delta^+$ T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA, USA) segundo instruções do fabricante.

3.5.3.1.2. Extração de RNA total das células NK e T $\gamma\delta$ e reação de transcrição reversa (RT-PCR)

As células obtidas após separação pelas esferas magnéticas foram utilizadas para extração do RNA total utilizando-se o kit RNeasy Micro (Qiagen, EUA) segundo instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado no aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, EUA) e estocado a -70°C . A pureza do RNA

foi verificada pela observação das razões de absorvância: 260/280nm (~2.0) e 260/230nm (~1.8-2.2).

O RNA obtido de cada grupo experimental foi tratado com DNase I, RNase-free (Fermentas) segundo o protocolo do fabricante. O DNA complementar foi sintetizado a partir do *primer* oligo (dT)15 (Invitrogen) com a enzima transcriptase reversa ImProm-II™ (Promega) em solução contendo tampão da enzima, cloreto de magnésio a 3 mM e dinucleotídeos sintéticos (adenina, guanina, citosina e timidina) a 0,5 mM. O produto foi dosado por espectrofotometria utilizando-se o aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer.

3.5.3.1.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-time PCR*)

Em cada reação foram utilizados 100ng de cDNA, *primers* (*forward e reverse*) na concentração de 10 pmol/μL e Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) em um volume final de reação de 10μL, sendo que as reações foram feitas em placas MicroAmp (Applied Biosystems). A temperatura de anelamento utilizada foi de 60°C para todos os genes amplificados. Os *primers* utilizados e suas sequências foram desenhadas com auxílio do software Primer 3 (Versão 0.4.0; Rozen & Skaletsky, 2000) e estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Sequência direta	Sequência reversa
β-actina	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT
IFN-γ	ACGGCACAGTCATTGAAAGCCTA	CTCACCATCCTTTTGCCAGTTCC
IL-17	GAAGCTCAGTGCCGCCA	TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT
Tbet	CCTGGACCCAACTGTCAACT	AACTGTGTTCCCGAGGTGTC
Rorγt	TGCAAGACTCATCGACAAGGC	AGCTTTTCCACATGTTGGCTG
Prf1	TGGAGGTTTTTGTACCAGGC	TAGCCAATTTTGCAGCTGAG
Gzmb	CATGTAGGGTCGAGAGTGGG	CCTCCTGCTACTGCTGACCT
CD69	GTACAATTGCCCAGGCTTGT	TCCAATGTTCCAGTTCACCA
Lamp-1	GATACAGTGGGGTTTGTGGG	GTGGCAACTTCAGCAAGGA
FasL	GCAGCAGCCCATGAATTACC	AGATGAAGTGGCACTGCTGTCTAC
IL-10	GGACAACATACTGCTAACCGACTCCT	CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT

As reações foram feitas no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e a expressão relativa de cada gene foi calculada segundo o método comparativo $\Delta\Delta C_t$, utilizando-se a beta-actina como gene constitutivo e o grupo salina como referência. Todos os primers utilizados possuem eficiência semelhante, que foi verificada através de uma curva padrão relativa.

3.5.3.2. Avaliação da produção de citocinas pelas células totais do pulmão por meio da técnica de ELISPOT

Após obtenção das células totais do pulmão dos animais segundo o protocolo descrito no item 3.5.2.1, foram utilizadas 1×10^5 células para o ensaio de ELISPOT (BD Biosciences). Inicialmente, placas de nitrocelulose de 96 poços (Millipore IIA) foram sensibilizadas com os anticorpos de captura específicos para IFN- γ e IL-4 a 4°C, durante a noite. Após o tempo de incubação, a placa foi lavada com solução de bloqueio (RPMI-1640). A seguir, adicionou-se 200 μ L da solução de bloqueio na placa e incubou-se por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, descartou-se a solução de bloqueio e foram adicionadas aos poços, as células totais do pulmão juntamente com os estímulos: concanavalina-A (20 μ g/mL) como controle e rHsp65 (10 μ g/mL) como estímulo específico. As células foram incubadas por 48 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com água deionizada e incubadas com 100 μ L/poço do anticorpo biotilado (BD Biosciences) diluído em tampão de diluição (PBS contendo 10% de soro bovino fetal), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas com solução contendo PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (Vetec). A seguir, foi adicionada a enzima conjugada (Streptavidina-HRP) (BD Biosciences) diluída em tampão de diluição e as placas incubadas novamente por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem e foi adicionado 100 μ L de solução final de detecção (BDTM AEC reagente + BDTM solução substrato), com incubação por até 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, as placas foram lavadas com água deionizada para parar a reação e a leitura avaliada em seguida por Bioreader-3000 Biosys utilizando o programa ImmunoSpot.

3.5.4. Análise histológica do pulmão dos animais

3.5.4.1. Avaliação do infiltrado inflamatório no pulmão

Após ter sido promovida a eutanásia dos animais, o pulmão esquerdo foi coletado e congelado a -70°C em meio apropriado para congelamento de tecidos: Tissue-Tek (O.C.T. Compound TM) como descrito no item 3.5.1. Foram realizados de 5 a 10 cortes seriados de cada pulmão, os quais foram posteriormente fixados com acetona por 10 minutos em lâminas pré-tratadas com solução de poli-L- lisina 1% (SIGMA) para realização da histologia.

Pelo menos uma lâmina de cada animal, contendo três cortes de pulmão, foi corada pela técnica de hematoxilina e eosina e observada em microscópio óptico para análise da presença de infiltrado inflamatório em toda a extensão do órgão. Os outros cortes foram utilizados no protocolo de imunohistoquímica para marcação das células NK e T $\gamma\delta$ *in situ*.

3.5.4.2. Marcação das células NK e T $\gamma\delta$ *in situ*

A marcação das células NK e T $\gamma\delta$ no pulmão dos animais foi realizada pelo método ABC (Complexo avidina e biotina). Para isso, os cortes foram obtidos do pulmão como descrito no item anterior e fixados em acetona gelada 100% por 10 minutos. Os cortes foram delimitados com uma caneta hidrofóbica (Dako Pen) e em seguida, foram lavados 2 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Vetec) por 3 minutos. Em seguida, bloqueou-se a peroxidase endógena pela adição de 50 μL /corte da solução de PBS 1X contendo H_2O_2 3% durante 30 minutos no escuro. Após lavagem, bloqueou-se a avidina-biotina endógena, através da adição dos reagentes A e B (20 μL /corte) do kit Avidin-Biotin (Vector), sendo o reagente A adicionado primeiramente ao corte com tempo de incubação de 15 minutos e após lavagem, adicionou-se o reagente B durante o mesmo intervalo de tempo. Após este passo, os cortes foram lavados, e em seguida foi realizado o bloqueio de reações inespecíficas, durante 1 hora a temperatura ambiente, por meio da aplicação de uma solução de PBS contendo 3%

de leite em pó desnatado e 10% de soro de camundongo (50 μ L/corte). Decorrido o tempo de incubação, escoou-se a solução de bloqueio e acrescentou-se ao corte a solução contendo os anticorpos primários diluídos 1:200 em PBS com 1% de BSA. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários purificados: anti-CD49b (clone HMa2, eBioscience) para marcação das células NK e anti-T $\gamma\delta$ (clone GL3, BD Biosciences) para marcação das células T $\gamma\delta$. A marcação com o anticorpo primário foi realizada em câmara úmida overnight a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados e adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (anti-hamster IgG, Vector) na concentração de 1:200 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se o complexo AB (VECTASTAIN Elite ABC kit, Vector) diluído em PBS 1X contendo BSA a 1% por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados novamente para revelação da reação pela adição do reagente DAB (DAB Substrate Kit for Peroxidase, Vector) preparado da seguinte maneira: 1mL de água destilada, 20 μ L de água oxigenada do kit, 20 μ L do tampão específico do kit e 40 μ L de DAB. Os cortes marcados com anticorpo específico para NK foram revelados após 20 segundos com a solução de DAB diluída 1:1, enquanto os cortes marcados com T $\gamma\delta$ foram revelados após 30 segundos da adição da solução de DAB concentrada. A reação foi parada com água destilada e os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Meyer.

3.5.5. Análise estatística

Todos os valores obtidos nos experimentos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa *GraphPad Prism 4* através da análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, ou através do teste *t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliações realizadas em diferentes tempos experimentais após infecção com Mtb

O objetivo geral do trabalho consistiu na caracterização das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ durante a imunoterapia da tuberculose experimental com a vacina gênica DNAhsp65, associada ou não ao tratamento com isoniazida e rifampicina. No entanto, antes de verificarmos o efeito das terapias nessas populações celulares, analisamos estas células em animais infectados (grupo infectado) ou não (grupo controle) com Mtb por via intra-traqueal, para traçarmos o perfil destas populações celulares em animais somente infectados com Mtb. Para isso, camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com aproximadamente 8 semanas de idade foram infectados com a cepa virulenta de Mtb H37Rv. Nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção (Figura 1a), coletou-se as amostras dos animais dos grupos controle e infectado para análise das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ no pulmão e contagem das UFCs no pulmão, baço e fígado.

4.1.1. Determinação da carga bacilar no pulmão, baço e fígado

Os gráficos da figura 2 demonstram a quantidade de micobactéria recuperada do pulmão, baço e fígado dos animais em diferentes tempos após a infecção. A contagem do número de colônias foi feita após crescimento da bactéria em meio de cultura sólido 7H11 e o valor foi corrigido de acordo com as diluições e o peso dos órgãos expresso em $\log_{10}$ por grama de órgão. É possível observar o aumento progressivo em escala logarítmica da carga bacilar no pulmão e baço até o dia 70, alcançando a média de 7,792 $\log_{10}$ e 6,555 $\log_{10}$, respectivamente. Enquanto no fígado, a maior quantidade de UFC foi detectada no dia 15 após a infecção (média de 3,659 $\log_{10}$) e permaneceu constante até o dia 70.

Figura 2. Quantidade de UFC no pulmão (a), baço (b) e fígado (c) dos animais em diferentes tempos após a infecção. Camundongos BALB/c foram infectados com Mtb cepa H37Rv no dia 0 e a coleta das amostras realizada nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

4.1.2. Análise das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ no pulmão dos animais

Diante do perfil de crescimento da micobactéria em nosso modelo de infecção, procedemos à análise das células T não convencionais e suas subpopulações no pulmão, órgão primário de infecção, dos animais infectados ou não com Mtb pela técnica de citometria de fluxo. As células NK, NKT e T $\gamma\delta$ foram analisadas dentro da população de linfócitos, determinada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granularidade (SSC - *Side Scatter*) (Figura 3).

As células NK e NKT foram definidas segundo a expressão das moléculas CD3 ϵ , componente do complexo TCR; e CD49b, glicoproteína transmembrana que compõe o

complexo da integrina VLA-2 (NK: $CD3^-CD49b^+$; NKT: $CD3^+CD49b^+$). As subpopulações de células NK foram analisadas segundo a expressão das moléculas CD11b, componente do complexo Mac-1 de 170 kDa, também conhecido como receptor de complemento 3 (CR3); e CD27, glicoproteína transmembrana de 45 kDa e membro da família do receptor de TNF ($CD11b^{low}CD27^{high}$, $CD11b^{high}CD27^{high}$, $CD11b^{high}CD27^{low}$), como proposto por Hayakawa *et al.*, 2006 e demonstrados na figura 3.

Enquanto as células T $\gamma\delta$ foram caracterizadas segundo a expressão das moléculas CD3 ϵ e $\gamma\delta$, cadeias componentes do TCR ($CD3^+\gamma\delta^+$). E as respectivas subpopulações definidas segundo a expressão da molécula CD27 ($CD27^+$, $CD27^-$), como descrito por Ribot *et al.*, 2009 e demonstrado na figura 3. Todos os resultados referentes à citometria de fluxo estão expressos segundo a frequência e o número absoluto das células dentro da população de linfócitos total.

Figura 3. Representação esquemática da análise das células NK ($CD3^-CD49b^+$), NKT ($CD3^+CD49b^+$), T $\gamma\delta$ ($CD3^+\gamma\delta^+$) e suas respectivas subpopulações por meio da técnica de citometria de fluxo.

4.1.2.1. Células *natural killer*

Considerando a análise isolada de cada população celular, na figura 4a, observa-se a frequência das células NK ($CD3^+ CD49b^+$) no pulmão dos animais controle e infectado, que permaneceu em torno de 10% em todos os tempos experimentais analisados. Nos dias 30 e 70 após a infecção, a frequência das células NK diminuiu no grupo infectado em relação aos animais do grupo controle (Figura 4a). Quanto ao número de células NK, analisadas dentro da população de linfócitos (Figura 4b), observou-se aumento significativo no grupo infectado no período inicial, sendo que este aumento foi estatisticamente significativo até o dia 70 após a infecção em relação aos animais do grupo controle.

Figura 4. Quantificação de células NK presente no pulmão dos animais. Animais não infectados com Mtb, grupo controle ($\square$), e infectados com Mtb, grupo infectado ($\blacktriangle$). A coleta das amostras foi realizada nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção, para obtenção das células totais do pulmão e determinação da **A)** Frequência e **B)** número das células NK ($CD3^+ CD49b^+$) dentro da população de linfócitos. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e infectado dentro de cada dia experimental.

Com o intuito de melhor caracterizar a população de células NK encontrada no pulmão dos animais, analisou-se as subpopulações destas células diferenciadas segundo a expressão dos marcadores CD11b e CD27 como descrito por Hayakawa *et al.* em 2006. A subpopulação de célula NK de maior frequência tanto em animais controle quanto nos infectados foi aquela de fenótipo: CD11b^{high}CD27^{low}, descrita por possuir alto limiar de ativação, compreendendo cerca de 70% do total das células NK no pulmão (Figura 5a). As outras subpopulações de células NK estavam presentes em menor porcentagem, aproximadamente 10%, sendo que houve aumento significativo do fenótipo de maior capacidade efetora caracterizado como CD11b^{high}CD27^{high} nos dias 7 e 15 após a infecção no grupo infectado (Figura 5b). No dia 15, também ocorreu aumento significativo neste grupo da célula NK CD11b^{low}CD27^{high}, subpopulação mais imatura que predomina na medula óssea e linfonodo (Figura 5c).

Figura 5. Frequência das subpopulações de células NK presente no pulmão dos animais. Animais não infectados com Mtb, grupo controle (□), e infectados com Mtb, grupo infectado (▲). A coleta das amostras foi realizada nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção, para obtenção das células totais do pulmão e determinação da quantidade relativa das subpopulações de células NK (CD3⁺CD49b⁺): A) CD11b^{high}CD27^{low}, B) CD11b^{high}CD27^{high}, C) CD11b^{low}CD27^{high}. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. *p<0,05, diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e infectado dentro de cada dia experimental.

4.1.2.2. Células T *natural killer*

Em relação à variação das células NKT ($CD3^+ CD49b^+$) durante os diferentes tempos experimentais após a infecção, não foi vista diferença significativa na sua frequência, variando de 2 a 4% dentro da população de linfócitos (Figura 6a). Por outro lado, na figura 6b, observa-se aumento significativo na quantidade absoluta destas células no grupo infectado quando comparado aos animais controle a partir do 7º dia após a infecção com Mtb.

Figura 6. Quantificação de células NKT presente no pulmão dos animais. Animais não infectados com Mtb, grupo controle (□), e infectados com Mtb, grupo infectado (▲). A coleta das amostras foi realizada nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção para obtenção das células totais do pulmão e determinação da: **A)** Frequência e **B)** número das células NKT ($CD3^+ CD49b^+$) dentro da população de linfócitos. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e infectado dentro de cada dia experimental.

4.1.2.3. Células T $\gamma\delta$

Quanto à análise realizada utilizando-se marcadores específicos para as células T $\gamma\delta$, verificou-se aumento significativo na frequência destas células no dia 30 após a infecção no grupo infectado (Figura 7a). Em relação ao número absoluto, observou-se aumento das células T $\gamma\delta$ nos dias experimentais: 7, 30 e 70 após a infecção no grupo de animais infectados quando comparado ao grupo controle (Figura 7b).

Figura 7. Quantificação de células T $\gamma\delta$ presente no pulmão dos animais. Animais não infectados com Mtb, grupo controle (□), e infectados com Mtb, grupo infectado (▲). A coleta das amostras foi realizada nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção para obtenção das células totais do pulmão e determinação da: **A)** Frequência e **B)** número das células T $\gamma\delta$ (CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺) dentro da população de linfócitos. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. *p<0,05, diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e infectado dentro de cada dia experimental.

Além disso, procedeu-se à análise das subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ diferenciadas segundo a expressão da molécula CD27 conforme descrito por Ribot *et al.* em 2009. A célula T $\gamma\delta$ CD27⁻, caracterizada pela maior produção de IL-17, estava presente em maior proporção no pulmão dos animais dos dois grupos analisados (aproximadamente 70% das células T $\gamma\delta$ totais) (Figura 8a). No entanto, não foi vista variação significativa entre as subpopulações nos dias experimentais; exceto no dia 30, em que houve discreto aumento na frequência do fenótipo CD27⁺, caracterizado pela produção de IFN- γ , no grupo infectado (Figura 8b).

Figura 8. Frequência das subpopulações de células T $\gamma\delta$ presentes no pulmão dos animais. Animais não infectados com Mtb, grupo controle ($\square$), e infectados com Mtb, grupo infectado ($\blacktriangle$). A coleta das amostras foi realizada nos dias 1, 7, 15, 30 e 70 após a infecção para obtenção das células totais do pulmão e determinação da quantidade relativa das subpopulações de células T $\gamma\delta$ (CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺): **A)** CD27⁻, **B)** CD27⁺. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e infectado dentro de cada dia experimental.

4.2. Avaliações realizadas em animais infectados com Mtb e que receberam os diferentes tratamentos

Após análise quantitativa das populações de células NK, NKT e T $\gamma\delta$ no pulmão dos animais no decorrer da infecção por Mtb, avaliamos a modulação destas células nos animais infectados que receberam os diferentes tratamentos. No dia 30 após a infecção com Mtb H37Rv, os animais receberam as diferentes terapias: vetor pVAX1, vacina DNAhsp65, drogas RIF e INH, e vacina DNAhsp65 em associação às drogas. Os animais do grupo salina receberam salina 0,9% via intramuscular e água autoclavada via gavagem, e foram utilizados como controle positivo da infecção. O tratamento teve duração total de trinta dias e dez dias após a última dose foi promovida a eutanásia dos animais para coleta das amostras e realização das análises subsequentes.

4.2.1. Determinação da carga bacilar no pulmão, baço e fígado

Como controle da eficácia da vacina DNAhsp65 já comprovada em outros trabalhos do grupo, realizou-se a determinação da carga bacilar presente no pulmão, baço e fígado dos animais. É possível observar na figura 9 o efeito sistêmico da terapia aplicada devido à diminuição de UFC no pulmão em 0,78 $\log_{10}$ no grupo DNAhsp65 quando comparado ao grupo salina, o que corresponde à quantidade de UFC aproximadamente 6 vezes menor nestes animais vacinados. Em relação ao grupo vetor, os animais que receberam DNAhsp65 apresentaram diminuição de cerca de 0,771 $\log_{10}$ no pulmão (~5,9 vezes menos UFC). No baço, também se observou redução significativa de UFC no grupo DNAhsp65 em relação aos grupos salina e vetor. E, por fim no fígado, a quantidade de UFC permaneceu semelhante entre os grupos salina, vetor e DNAhsp65. Nos grupos tratados com drogas e com a associação da quimioterapia com a imunoterapia, o número de bacilos ficou abaixo do limite de detecção da técnica nos três órgãos analisados neste dia 70.

Figura 9. Determinação de UFC no pulmão (a), baço (b) e fígado (c) dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas), ou salina como controle positivo da infecção (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, foi realizada coleta das amostras e análises subsequentes. Os resultados dos subitens **a** e **b** representam a média de três experimentos independentes, enquanto o subitem **c** representa um único experimento. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa entre os grupos DNAhsp65 e salina. # $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa entre os grupos DNAhsp65 e vetor.

4.2.2. Análise histológica do pulmão

Outro parâmetro utilizado na verificação da eficácia das terapias empregadas foi a análise histológica do pulmão dos animais. Para isso, retirou-se o pulmão esquerdo dos camundongos e realizou-se a coloração com os corantes: hematoxilina e eosina, segundo protocolo descrito na seção de materiais e métodos. Observou-se que o pulmão dos animais do grupo DNAhsp65 (Figura 10d) quando comparado aos grupos salina (Figura 10f) e vetor (Figura 10e) apresentava menor área inflamada e maior preservação do parênquima pulmonar. E a associação da vacina DNAhsp65 à quimioterapia (Figura 10b) propiciou maior conservação da arquitetura pulmonar e diminuição considerável dos infiltrados inflamatórios.

Figura 10. Análise histológica do pulmão dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: **B)** associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas), **C)** drogas RIF e INH (grupo drogas), **D)** vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), **E)** vetor pVAX1 (grupo vetor), ou **F)** salina como controle positivo da infecção (grupo salina). O subitem A representa amostra de pulmão do animal não infectado (grupo controle). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, foi promovida a eutanásia dos animais e o pulmão esquerdo retirado para realização das análises histológicas. As fotos foram capturadas na objetiva de 10x no microscópio Leica.

4.2.3. Determinação da produção de citocinas pelas células no pulmão dos animais

Como primeira análise do perfil da resposta imune desencadeada após administração dos diferentes tratamentos realizou-se o ensaio de ELISPOT para quantificar a produção de citocinas pelas células totais do pulmão dos animais (Figura 11). Verificou-se aumento

significativo da produção de IFN- γ pelas células provenientes dos animais do grupo DNAhsp65 em relação aos grupos salina e drogas. Enquanto, os níveis de IL-4 permaneceram semelhantes entre os grupos. Interessantemente, quando comparamos a porcentagem de variação da produção da citocina IFN- γ sobre a produção de IL-4, observamos cerca de 24% e 130% mais IFN- γ em relação à IL-4 nos grupos DNAhsp65 e DNAhsp65-drogas, respectivamente, tendo a razão IFN- γ /IL-4 do grupo salina como referência.

Figura 11. Frequência de células produtoras das citocinas IFN- γ e IL-4 no pulmão dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas), ou salina como controle positivo da infecção (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina foi realizada a coleta das amostras para análises subsequentes. A quantidade de células totais do pulmão específicas para rHsp65 e produtoras de IFN- γ e IL-4 foi determinada através do ensaio de ELISPOT. A % de variação IFN- γ /IL-4 foi calculada segundo a razão da média dos valores obtidos de IFN- γ e IL-4 para cada grupo, considerando-se a amostra salina como referência. Os resultados expressam a média de dois experimentos independentes. * e # indicam $p < 0,05$ em relação aos grupos salina e drogas, respectivamente.

4.2.4. Análise das células T não convencionais no pulmão

Considerando a modulação inicial das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ durante a infecção por Mtb e diante das evidências da resposta imune de perfil predominantemente Th1 desencadeado pela vacina DNAhsp65 e na associação DNAhsp65-Drogas, sugerido pelo resultado de ELISPOT e descrito na literatura (Bonato *et al.*, 2004; Rodrigues, 2011), procedeu-se à análise do perfil destas células nos animais infectados com Mtb e tratados com as diferentes terapias. As análises dos tipos celulares e suas respectivas subpopulações foram realizadas dez dias após a última dose da vacina (nos grupos DNAhsp65 e DNAhsp65-drogas) e da administração das drogas RIF e INH (nos grupos drogas e DNAhsp65-drogas), ou seja, no dia 70, no intuito de avaliar o efeito geral dessas terapias sobre estas células.

4.2.4.1. Análise das populações celulares *in situ*

Inicialmente, foi realizada a marcação das células NK e T $\gamma\delta$ diretamente no tecido pulmonar dos animais. Esta primeira análise foi feita com o objetivo de avaliarmos a distribuição das células em estudo no pulmão dos animais para depois realizarmos as quantificações relativas e absolutas destas células pela técnica de citometria de fluxo. A coloração marrom indica uma marcação positiva para as células específicas. Nesse sentido, foi possível observar a predominância tanto das células NK quanto das T $\gamma\delta$ principalmente no infiltrado inflamatório presente no pulmão e que está em destaque nas fotos abaixo (Figuras 12 e 13).

Figura 12. Análise *in situ* das células NK detectada no pulmão dos animais através da técnica de imunohistoquímica. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: **A)** drogas em associação à vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-Drogas), **B)** drogas, **C)** DNAhsp65, **D)** Vetor e **E)** Salina. Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, o pulmão esquerdo foi retirado para marcação das células NK através da técnica de imunohistoquímica. As fotos foram capturadas na objetiva de 40x no microscópio Leica, tendo como foco principal o infiltrado inflamatório.

Figura 13. Análise *in situ* das células T $\gamma\delta$ detectada no pulmão dos animais através da técnica de imunohistoquímica. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: **A)** drogas em associação à vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-Drogas), **B)** drogas, **C)** DNAhsp65, **D)** Vetor e **E)** Salina. Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, o pulmão esquerdo foi retirado para marcação das células T $\gamma\delta$ através da técnica de imunohistoquímica. As fotos foram capturadas na objetiva de 40x no microscópio Leica, tendo como foco principal o infiltrado inflamatório.

4.2.4.2. Quantificação das células *natural killer* no pulmão dos animais

Após a observação do predomínio das células NK no infiltrado inflamatório presente no pulmão dos animais, realizou-se a quantificação destas células por citometria de fluxo. Na figura 14a, observa-se aumento significativo da frequência de células NK no pulmão dos animais tratados somente com as drogas em relação aos grupos: salina e vetor. Quanto ao número absoluto, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 14b).

Figura 14. Quantificação de células NK presente no pulmão dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas), ou salina como controle positivo da infecção (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se a coleta das amostras para obtenção das células totais do pulmão e determinação da: **A)** Frequência e **B)** Número absoluto das células NK (CD3⁺CD49b⁺) dentro da população de linfócitos pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. *p<0,05, diferença estatisticamente significativa entre os grupos drogas e salina. #p<0,05, diferença estatisticamente significativa entre os grupos drogas e vetor.

Dentre as subpopulações de células NK presentes no pulmão, aquela de fenótipo $CD11b^{high}CD27^{low}$ foi a mais frequente em todos os animais independente do tratamento empregado (Figura 15a). As outras duas subpopulações variaram de 5 a 15%, mas também permaneceram semelhantes entre os grupos (Figura 15b e 15c).

Figura 15. Frequência das subpopulações de células NK presente no pulmão dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas), ou salina como controle positivo da infecção (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais do pulmão e determinação das respectivas subpopulações de células NK ($CD3^+CD49b^+$): **A)** $CD11b^{high}CD27^{low}$, **B)** $CD11b^{high}CD27^{high}$, **C)** $CD11b^{low}CD27^{high}$ por meio da técnica de citometria de fluxo. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

4.2.4.3. Quantificação das células T *natural killer* no pulmão dos animais

Quanto às células NKT, não houve modulação aparente deste tipo celular nos diferentes grupos estudados (Figura 16). Observou-se aumento no número destas células dentro da população de linfócitos do grupo DNAhsp65-Drogas, no entanto esta diferença não foi significativa.

Figura 16. Quantificação de células NKT presentes no pulmão dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas), ou salina como controle positivo da infecção (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais do pulmão e determinação da: **A**) Frequência e **B**) Número absoluto das células NKT (CD3⁺CD49b⁺) dentro da população de linfócitos por meio da técnica de citometria de fluxo. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

4.2.4.4. Quantificação das células T $\gamma\delta$ no pulmão dos animais

Já as células T $\gamma\delta$, apesar de apresentarem número absoluto em torno de 1×10^5 em todos os grupos, interessante observou-se variação na sua frequência entre os diferentes tratamentos (Figura 17a). O grupo DNAhsp65-Drogas demonstrou a maior porcentagem em relação a todos os outros grupos, seguido do grupo drogas e do grupo DNAhsp65, sendo este aumento significativo no dia 70. Esses resultados sugerem que dentre os efeitos da vacina DNAhsp65 esteja a modulação das células T $\gamma\delta$, sendo que este efeito parece ser aumentado na associação DNAhsp65-drogas.

Figura 17. Quantificação de células T $\gamma\delta$ presente no pulmão dos animais infectados. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas), ou salina como controle positivo da infecção (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais do pulmão e determinação da **A**) Frequência e **B**) Número absoluto das células T $\gamma\delta$ (CD3⁺γδ⁺) dentro da população de linfócitos, por meio da técnica de citometria de fluxo. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. Os símbolos *, #, &, § indicam diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ em relação aos grupos: drogas, DNAhsp65, vetor e salina, respectivamente.

Entre as células T $\gamma\delta$, a subpopulação de fenótipo CD27⁻ estava presente em maior quantidade, em torno de 70 a 80% (Figura 18). No grupo drogas houve aumento estatisticamente significativo do fenótipo CD27⁺ comparado aos animais somente infectados (grupo salina).

Figura 18. Frequência das subpopulações de células T $\gamma\delta$ presente no pulmão dos animais Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os diferentes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas), ou salina como controle positivo da infecção (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais do pulmão e determinação dos subtipos de células T $\gamma\delta$ (CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺): **A**) CD27⁻, **B**) CD27⁺, por meio da técnica de citometria de fluxo. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. *p<0,05, diferença estatisticamente significativa entre os grupos drogas e salina.

4.2.5. Análise da expressão de citocinas e marcadores de ativação em células NK e T $\gamma\delta$ por PCR em tempo real

A partir dos dados de quantificação absoluta e relativa das células T não convencionais no pulmão dos animais, analisou-se a funcionalidade destas células pela detecção das principais citocinas e outras moléculas envolvidas na resposta imune efetora de cada população. Para tanto, as células em estudo foram purificadas de cada grupo experimental por meio de esferas magnéticas com rendimento de aproximadamente 70-80%, e seu material genético foi extraído para análise da expressão de citocinas, marcadores de ativação e fatores

transcricionais pela técnica de PCR em tempo real. Os valores de expressão estão mostrados em relação ao grupo salina, considerado a amostra de referência.

Na figura 19 estão demonstrados os níveis de expressão relativa das principais moléculas relacionadas às funções efetoras das células NK. O grupo vetor apresentou níveis de expressão de todas as moléculas analisadas nas células NK muito próximos ao do grupo salina, exceto quanto ao marcador de degranulação - Lamp1 ou CD107a que teve menor expressão nos animais que receberam somente o vetor como tratamento. E o menor nível de expressão para essa molécula foi vista no grupo DNAhsp65.

O nível de expressão de perforina, granzima B e IFN- γ nas células NK foi menor nos grupos drogas e DNAhsp65-drogas seguido do grupo DNAhsp65. Enquanto a molécula CD69, marcador de ativação das células NK, estava mais expressa nestes grupos, com exceção dos animais vacinados com DNAhsp65 em que não houve diferença em relação aos animais somente infectados (grupo salina) (Figura 19).

A maior quantidade da citocina IL-10 nas células NK foi vista nos grupos de animais que receberam a quimioterapia associada ou não à vacina de DNAhsp65. Nestes grupos também se observou maior expressão de FasL, assim como nos animais vacinados com DNAhsp65 (Figura 19).

Figura 19. Níveis de expressão relativa de diferentes genes em células NK obtidas do pulmão dos animais. Camundongos BALB/c infectados com Mtb e submetidos aos diferentes tratamentos foram sacrificados dez dias após a última dose da terapia para obtenção das células totais do pulmão. A partir destas células, realizou-se a separação das células NK através de esferas magnéticas para subsequente extração do RNA total e quantificação dos níveis de expressão dos genes: Prf, IFN- γ , Gzmb, CD69, IL-10, Lamp1 e FasL, pela técnica de PCR em tempo real, utilizando o grupo salina como referência.

Na figura 20 estão demonstrados os níveis de expressão relativa das citocinas IL-17 e IFN- γ , os fatores de transcrição Ror γ t e Tbet e da molécula FasL nas células T $\gamma\delta$. A análise dessas moléculas foi realizada partindo do princípio de que a subpopulação de célula T $\gamma\delta$ de fenótipo CD27⁺ caracteriza-se pela expressão do fator de transcrição T-bet e produção da citocina IFN- γ . Enquanto a célula T $\gamma\delta$ CD27⁻, caracteriza-se pela expressão de Ror γ t e da citocina IL-17, como descrito por Ribot *et al.*, 2009. Nos grupos vetor e DNAhsp65 observou-se maior expressão de IL-17, IFN- γ e Tbet em relação ao grupo salina. Enquanto as outras moléculas analisadas (Ror γ t e FasL) foram menos expressas em todos os grupos que receberam os diferentes tratamentos. Apesar das células T $\gamma\delta$ terem sido detectadas em maior frequência no pulmão dos animais dos grupos drogas e DNAhsp65-drogas, estas células apresentaram menor funcionalidade em termos de produção de citocinas quando comparado ao grupo salina. Em contrapartida, no grupo DNAhsp65 houve aumento na porcentagem e também na expressão de IFN- γ e IL-17 pelas células T $\gamma\delta$, sugerindo uma modulação específica da vacinação com DNAhsp65.

Figura 20. Níveis de expressão relativa de diferentes genes em células T $\gamma\delta$ obtidas do pulmão dos animais. Camundongos BALB/c infectados com Mtb e submetidos aos diferentes tratamentos foram sacrificados dez dias após a última dose da terapia para obtenção das células totais do pulmão. A partir destas células, realizou-se a separação das células T $\gamma\delta$ através de esferas magnéticas para subsequente extração do RNA total e quantificação dos níveis de expressão dos genes: IL-17, IFN- γ , Ror γ t, Tbet e FasL, pela técnica de PCR em tempo real, utilizando o grupo salina como referência.

4.2.6. Quantificação das células T não convencionais no linfonodo dos animais

Considerando que algumas subpopulações de células NK são descritas por serem predominantes no linfonodo e com o intuito de completar a caracterização das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ nos animais infectados com Mtb e que receberam os diferentes tratamentos, realizou-se a quantificação dessas populações nos linfonodos cervicais, axilares e mediastínicos pela técnica de citometria de fluxo no dia 70.

4.2.6.1. Células *natural killer*

A frequência das células NK permaneceu em torno de 1% em todos os grupos e não houve variação significativa no número de células totais. No entanto, observou-se certa tendência no aumento do número de células NK nos grupos vetor e DNAhsp65, apesar de não ser significativa (Figura 21).

Figura 21. Quantificação de células NK presentes nos linfonodos dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os seguintes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas) ou salina (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais dos linfonodos cervicais, axilares e mediastino e determinação da **A)** Frequência e **B)** Número absoluto das células NK (CD3⁺CD49b⁺) dentro da população de linfócitos, por meio da técnica de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de um único experimento.

Interessantemente, no dia 70, as subpopulações de NK apresentaram proporções semelhantes de aproximadamente 30%, sendo que nos grupos drogas e DNAhsp65-drogas houve aumento significativo do fenótipo $CD11b^{low}CD27^{high}$. Em contrapartida, a subpopulação $CD11b^{high}CD27^{low}$ estava diminuída nestes dois grupos (Figura 22).

Figura 22. Frequência das subpopulações de células NK presentes nos linfonodos dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os seguintes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas) ou salina (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais dos linfonodos cervicais, axilares e mediastino e determinação dos subtipos de células NK ($CD3^+CD49b^+$): **A**) $CD11b^{low}CD27^{high}$, **B**) $CD11b^{high}CD27^{low}$, **C**) $CD11b^{high}CD27^{high}$ por meio da técnica de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de um único experimento. * e # indicam diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ em relação aos grupos vetor e salina, respectivamente.

4.2.6.2. Células T *natural killer*

Na figura 23 é possível observar que no dia 70, as células NKT constituem aproximadamente de 2 a 3% dos linfócitos totais dos linfonodos e não há diferença significativa entre os grupos. Portanto, assim como visto no pulmão, as terapias empregadas não parecem modular a frequência e quantidade absoluta da população geral de células NKT.

Figura 23. Quantificação de células NKT presentes nos linfonodos dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os seguintes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas) ou salina (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais dos linfonodos cervicais, axilares e mediastino e determinação da **A)** Frequência e **B)** Número absoluto das células NKT (CD3⁺CD49b⁺) dentro da população de linfócitos, através da técnica de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de um único experimento.

4.2.6.3. Células T $\gamma\delta$

Por último, as células T $\gamma\delta$ não demonstraram diferenças significativas entre os grupos analisados quanto à frequência e número de células no linfonodo dos animais. Além disso, a porcentagem desse tipo celular permaneceu muito próxima daquela encontrada no pulmão, em torno de 2 a 4% dos linfócitos totais (Fig. 24).

Figura 24. Quantificação de células T $\gamma\delta$ presentes nos linfonodos dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os seguintes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas) ou salina (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais dos linfonodos cervicais, axilares e mediastino e determinação da: **A)** Frequência e **B)** Número absoluto das células T $\gamma\delta$ (CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺) dentro da população de linfócitos, por meio da técnica de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de um único experimento.

Apesar de não ter sido verificada modulação positiva das células T $\gamma\delta$ no linfonodo como aquela vista no pulmão dos animais tratados com a vacina DNAhsp65, observou-se um fenômeno interessante quanto à proporção das suas subpopulações. Como mostrado no gráfico da figura 25, o linfócito T $\gamma\delta$ CD27⁺, ao contrário do que foi visto no pulmão, estava presente em maior quantidade no linfonodo de todos os animais infectados, sendo estatisticamente significativa a diferença entre os grupos drogas e DNAhsp65-drogas em

relação ao grupo vetor no dia 70. E coerentemente, a célula T $\gamma\delta$ de fenótipo CD27⁻ encontrava-se diminuída nestes dois grupos.

Figura 25. Frequência das subpopulações de células T $\gamma\delta$ presentes nos linfonodos dos animais. Os animais foram infectados com Mtb H37Rv no dia 0 e trinta dias após a infecção receberam os seguintes tratamentos: vetor pVAX1 (grupo vetor), vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65), drogas RIF e INH (grupo drogas), associação drogas e vacina DNAhsp65 (grupo DNAhsp65-drogas) ou salina (grupo salina). Dez dias após a última dose da vacina e das drogas, realizou-se coleta das amostras para obtenção das células totais dos linfonodos cervicais, axilares e mediastino e determinação dos subtipos de células T $\gamma\delta$ (CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺): **A)** CD27⁺, **B)** CD27⁻, por meio da técnica de citometria de fluxo. Os resultados são representativos de um único experimento. *p<0,05, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo vetor.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Com o avanço da tecnologia, a cada dia surgem novas ferramentas cada vez mais refinadas que nos permitem explorar o universo da interação patógeno versus hospedeiro na busca de estratégias que possam ser úteis na melhora da qualidade de vida das pessoas diante do cenário mundial de doenças que ainda atingem a população em larga escala como a TB. O entendimento da patogênese da TB e a resposta imune protetora associada, apesar de complexas, são de extrema importância e esses aspectos estão longe de serem totalmente desvendados. Nesse sentido, dentre alguns pontos que permanecem obscuros está a participação de células da imunidade inata na TB. Isto porque acredita-se que alguns indivíduos expostos a *Mtb* não desenvolvem a doença por possuírem mecanismos imunes inatos envolvidos no controle e eliminação eficientes do microrganismo (Walzl *et al.*, 2011). Apesar dessa idéia não ter sido claramente provada, nos últimos tempos tem-se discutido com mais frequência a participação de células da imunidade inata, especificamente das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ na resposta imune da TB a partir de observações de que não somente as células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ estão envolvidas no controle do crescimento bacteriano no sítio primário da infecção (Torrado *et al.*, 2011).

A necessidade de maior compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese das doenças deve-se em grande parte à ineficiência de vacinas e tratamentos existentes contra diversas doenças como a AIDS, malária, TB, entre outras (Pulendran & Ahmed, 2011). No caso específico da TB, a única vacina licenciada para uso em humanos, a BCG, possui eficácia variável e não protege contra as formas graves da doença em adultos. Além disso, o tratamento comumente empregado na rotina clínica é demasiadamente demorado, provoca diversos efeitos colaterais, propiciando o abandono do tratamento e consequentemente o aumento de infecções por cepas de *Mtb* resistente às drogas (Thaiss & Kaufmann, 2010).

Diante desse cenário, têm surgido diversas estratégias profiláticas e terapêuticas para TB e dentre elas está a vacina DNAhsp65. Esta vacina tem sido amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa, no entanto pouco se sabe sobre o efeito dessa vacina e da associação DNAhsp65-drogas nas células T não convencionais (NK, NKT e T $\gamma\delta$) do sistema imune em animais previamente infectados com *Mtb*. De modo geral, os resultados descritos neste trabalho demonstram aumento significativo das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ no pulmão dos animais infectados logo ao início da infecção por *Mtb*, assim como das subpopulações destas células associadas a funções efetoras de perfil protetor na TB. Além disso, com o intuito de

responder a pergunta principal do trabalho, ou seja, avaliar se as células T não convencionais estavam moduladas em animais que receberam como tratamento a vacina DNAhsp65, ou as drogas RIF e INH, ou ainda ambas as terapias, foram analisadas as frequências relativa e absoluta destas células no pulmão e linfonodo dos animais, assim como seu perfil de produção de citocinas. As principais observações realizadas nesse sentido incluem aumento significativo na porcentagem de células T $\gamma\delta$ nos animais tratados com a vacina DNAhsp65, drogas e com a associação DNAhsp65-Drogas; assim como a predominância de células NK de fenótipo ativado e com maior expressão de moléculas associadas à morte celular por apoptose. Estes dados em conjunto com outros abordados na seção de resultados sugerem a participação de células NK e T $\gamma\delta$, mas não de células NKT, na proteção desencadeada pela vacina DNAhsp65, assim como da associação DNAhsp65 e as drogas convencionais (RIF e INH) da TB.

O envolvimento das células NK, NKT e T $\gamma\delta$ na resposta imune da TB é descrito por vários autores, no entanto alguns resultados relacionados à importância destas células são controversos. Essas diferenças devem-se principalmente ao modelo de estudo empregado para entendimento da resposta imune na TB. O nosso modelo de infecção intra-traqueal de camundongos com alta carga bacilar caracteriza-se como um dos modelos mais apropriados para estudo da interação parasito-hospedeiro e teste de intervenções profiláticas e terapêuticas na TB. Isto porque, a resposta imune que se desenvolve nestes animais assemelha-se à doença progressiva vista em humanos, caracterizada por um padrão de resposta misto, com predominância do perfil Th1 através da produção de IFN- γ ao início da infecção, e conforme a doença progride ocorre aumento na produção das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β (Hirsch *et al.*, 1997; van Crevel *et al.*, 2000; Jamil *et al.*, 2007; Rook *et al.*, 2009; Moraes Fonseca *et al.*, 2010). Além disso, no início da infecção com 1×10^5 bacilos de Mtb, via intra-traqueal, ocorre aumento no número das células T CD4⁺, T CD8⁺ e dos macrófagos no pulmão dos animais e com o decorrer da infecção, estas populações celulares diminuem (Moraes Fonseca *et al.*, 2010). Estas observações estão em concordância com o que é visto em humanos infectados por Mtb, em especial aqueles provenientes de países em desenvolvimento onde a incidência da TB é alta, principalmente em relação à infecção com alta carga bacilar, levando a um aumento nos níveis de IL-4 e TGF- β que acabam por inibir os mecanismos imunes protetores na TB (Rook *et al.*, 2009).

Os dados iniciais relativos aos diferentes tempos experimentais apresentados neste trabalho complementam o conhecimento existente sobre as células do sistema imune no

modelo de infecção intra-traqueal com alta carga bacilar. Logo no primeiro dia após a infecção, verificou-se aumento significativo de células NK (Figura 4b) e no sétimo dia, das células NKT (Figura 6b) e $T\gamma\delta$ (Figura 7b) no pulmão dos camundongos infectados com Mtb. O aumento dessas populações celulares foi crescente até trinta dias após a infecção, o que pode ser relacionado à progressão da carga bacilar no pulmão, baço e fígado dos animais. Entre os dias 30 e 70 após a infecção, não é vista diferença significativa na quantidade de micobactéria no pulmão, baço e fígado dos animais (Figura 2), fato este que reforça a idéia do desenvolvimento da resposta imune adaptativa efetora após aproximadamente 20 dias de infecção e que seja capaz de conter o crescimento micobacteriano como comentado por Cooper *et al.* em 2009. Essa demora na detecção da imunidade adaptativa efetora no pulmão dos animais infectados com Mtb tem sido intimamente relacionada à cinética lenta da ativação das células T no linfonodo drenante, o que, por sua vez, possibilita o estabelecimento da infecção no sítio primário (Torrado *et al.*, 2011).

Junqueira-Kipnis *et al.* em 2003, também demonstraram o aumento de células NK, mas não de NKT, no pulmão de animais infectados com Mtb. No entanto, seu trabalho consistia na infecção de animais via aerosol e com baixa carga bacilar, o que pode explicar o aumento das células NK somente nas duas primeiras semanas de infecção. Além disso, os autores sugeriram função redundante das células NK no modelo estudado, pois não detectaram diferença significativa na carga bacilar no pulmão dos animais que tiveram essas células depletadas. Paralelamente, como nosso modelo de estudo baseia-se na infecção com alta carga bacilar e consequente desenvolvimento de padrão de resposta imune misto de perfil Th1/Th2, a modulação da resposta para um perfil predominantemente Th1 torna-se estratégia interessante a ser adotada, por exemplo, em intervenções terapêuticas para aumentar a atividade microbicida dos macrófagos, dentre outros mecanismos. Considerando isto e o fato das células NK serem importante fonte da citocina IFN- γ , assinatura do perfil Th1, a ativação dessa população celular ao início da infecção por Mtb em nosso modelo de estudo, pode ser que desempenhe função importante e não somente redundante. No entanto, mais estudos nesse sentido devem ser realizados para avaliar o efeito da ausência destas células em diferentes modelos de infecção, principalmente naqueles que mimetizam a infecção em humanos.

Assim como descrito por Hayakawa *et al.* em 2004 e observado neste trabalho, a população de células NK de fenótipo $CD11b^{high}CD27^{low}$ é a subpopulação predominante dentre as células NK do pulmão (Figura 5a) e também no sangue periférico. A importância do estudo dessas subpopulações reside no fato de possuírem funções peculiares relacionadas a

diferenças na expressão de diversos receptores como os de adesão e quimiocinas, além de possuírem distribuição tecidual distinta e padrões específicos de migração durante a resposta imune. Subpopulações funcionalmente distintas de células NK também são descritas em humanos e sua caracterização é feita segundo a expressão da molécula CD56 (Sedlmayr *et al.*, 1996). Nesse contexto, interessante, observamos aumento significativo da célula NK CD11b^{high}CD27^{high} (Figura 5b) nos dias 7 e 15 após a infecção. Essa subpopulação é descrita por possuir menor limiar de ativação e maior capacidade efetora relacionada à produção de citocinas e citotoxicidade (Hayakawa *et al.*, 2006). Estas funções associadas às células NK já foram descritas como aumentadas na infecção por Mtb (Saxena *et al.*, 2002; Junqueira-Kipnis *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2006), no entanto este é o primeiro relato do aumento dessa subpopulação específica de NK no modelo de infecção experimental da TB. Além disso, no dia 15 após a infecção, também aumentou a célula NK CD11b^{low}CD27^{high} (Figura 5c), caracterizada como imatura e predominante na medula óssea, considerada o sítio primário da geração de células NK (Hayakawa *et al.*, 2006). Esse resultado pode indicar aumento na demanda de células NK no sítio infeccioso (pulmão) o que levou ao recrutamento de células ainda imaturas para ajudarem na resposta imune local.

As células NKT analisadas em nosso trabalho compreendem os dois subtipos celulares descritos na literatura: as NKT variáveis (vNKT) e as invariáveis (iNKT) (Bendelac *et al.*, 1997). Cada subtipo relaciona-se a funções distintas, mas no geral, estas células também são descritas como importante fonte da citocina IFN- γ e desempenham funções efetoras relacionadas à proteção na TB (Bendelac *et al.*, 2007; Sada-Ovalle *et al.*, 2008). Nesse sentido um aumento geral dessa população celular ao início da infecção por Mtb nos permite supor a participação destas células durante a resposta imune inicial, assim como numa fase mais tardia, visto que estas células aumentaram em número significativamente em até 70 dias após a infecção (Figura 6b). Sugawara *et al.*, em 2002, demonstraram a menor produção de IFN- γ e de outras citocinas relacionadas ao padrão Th1 em camundongos deficientes de NKT. Além disso, também já foi demonstrado que a deficiência de moléculas CD1, relacionadas com a apresentação antigênica para células NKT, prejudica a produção de citocinas de perfil Th1 na infecção por Mtb (Szalay *et al.*, 1999). Mais recentemente em 2008, Choi *et al.*, demonstraram hiporresponsividade das iNKT no modelo de infecção bacteriana por *Listeria monocytogenes*, mas também já foram descritas algumas bactérias capazes de ativar diretamente essas células por meio do reconhecimento específico de seus antígenos glicolípidicos. As células NKT, em geral, também podem ser ativadas indiretamente via

citocinas (Tupin *et al.*, 2007), mecanismo este que pode estar envolvido na sua expansão durante a infecção por Mtb, como demonstrado na figura 6b.

Outro resultado interessante observado ao início da infecção por Mtb foi o crescente aumento no número das células T $\gamma\delta$ do dia 7 até o dia 30 (Figura 7b), seguido da diminuição desta população celular no pulmão dos animais. Resultado semelhante é visto no trabalho de Dieli *et al.* em 2003, em que animais infectados com *M. bovis* via intra-nasal apresentaram aumento significativo de células T $\gamma\delta$ no 7º dia, e dentre as funções destas células destacou-se seu papel na indução da atividade citotóxica e produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺, estabelecendo uma interface entre as imunidades inata e adaptativa. Em modelos de infecção com alta carga bacilar, as células T $\gamma\delta$ demonstram ter papel essencial no controle do crescimento micobacteriano principalmente por meio do recrutamento de monócitos para formação do granuloma (Ladel *et al.*, 1995). Essa última função está associada à produção da citocina IL-17 por estas células, em resposta à IL-23 secretada pelas células dendríticas ativadas (Lockhart *et al.*, 2006).

Geralmente a análise dos subtipos de células T $\gamma\delta$ restringe-se à classificação segundo as cadeias do TCR expressas na superfície celular. Ribot *et al.* em 2009 descreveram a existência de subpopulações funcionais de linfócitos T $\gamma\delta$ segundo a expressão da molécula CD27. Em seu trabalho, eles observaram a predominância da subpopulação CD27⁺ (70-90%) no linfonodo, baço, e tecidos periféricos (pulmão e intestino) de camundongos controle da linhagem C57BL/6 e rápida expansão da subpopulação CD27⁻ em resposta à infecção aguda. Em nosso estudo com camundongos da linhagem BALB/c, verificamos o contrário, ou seja, a predominância do linfócito T $\gamma\delta$ CD27⁻ (Figura 8a) no pulmão dos animais.

Além disso, Ribot *et al.* demonstraram em seu trabalho que as células de fenótipo CD27⁺ constituem-se de linfócitos T $\gamma\delta$ que produzem predominantemente IFN- γ ; enquanto o CD27⁻, são células essencialmente produtoras de IL-17. Considerando que a citocina IL-17 está envolvida principalmente no recrutamento de neutrófilos (Umemura *et al.*, 2007) e que alguns autores associaram maior acúmulo destas células em camundongos geneticamente suscetíveis a infecções (Eruslanov *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2006), sugere-se que a maior quantidade de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 (T $\gamma\delta$ CD27⁻) observado em BALB/c do que em C57BL/6 possa contribuir para a maior suscetibilidade da linhagem BALB/c na infecção por Mtb. Este resultado, a princípio intrigante, fez sentido quando associamos a diferença na distribuição das subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ às linhagens de camundongos

utilizadas. No entanto, mais experimentos devem ser realizados com o intuito de melhor caracterizar essas subpopulações de células T $\gamma\delta$ em diferentes linhagens de camundongos.

Quanto à modulação das subpopulações na infecção micobacteriana, somente no dia 30 após a infecção que observamos discreto aumento da célula T $\gamma\delta$ CD27⁺ (Figura 8b), a qual deve contribuir para um perfil predominantemente Th1 nesta fase da infecção (Moraes Fonseca *et al.*, 2010). É importante ressaltar que tanto o IFN- γ quanto a IL-17 são importantes na resposta imune da TB, e que é essencial o balanço entre essas duas citocinas. A falta ou excesso, seja de IFN- γ ou de IL-17, pode prejudicar o desenvolvimento da resposta imune efetora e eficaz no controle de Mtb (Rosenzweig & Holland, 2005; Barber *et al.*, 2011; Khader & Cooper, 2008).

Após analisarmos as frequências absoluta e relativa das células T não convencionais no modelo de infecção intra-traqueal com alta carga bacilar, procedemos à análise específica destas células em animais infectados com Mtb e que receberam os diferentes tratamentos. Isto porque a maioria das estratégias profiláticas e terapêuticas da TB visa à modulação da resposta imune adaptativa, descrita por conter o crescimento bacteriano, mas incapaz de eliminar completamente o microrganismo (Cooper, 2009). Nesse sentido, a ativação de mecanismos efetores iniciais que sejam eficazes na morte da micobactéria torna-se um artifício interessante a ser explorado em estratégias vacinais.

A vacina DNAhsp65, amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa, confere seus efeitos protetores na profilaxia e terapia da TB principalmente por meio da modulação da resposta imune para um perfil predominantemente Th1, sendo esta característica associada às vacinas de DNA em geral (Gurunathan *et al.*, 2000; Abdulhaqq & Weiner, 2008). Esse padrão foi sugerido em nosso estudo pelo ensaio de ELISPOT, em que verificamos aumento de células totais produtoras de IFN- γ no pulmão dos animais vacinados com DNAhsp65, assim como nos animais que receberam a associação DNAhsp65-Drogas, além da razão IFN- γ /IL-4 ter sido maior nestes animais (Figura 11).

Em 2003, Coelho-Castelo *et al.* demonstraram que a vacina DNAhsp65, quando administrada na forma de DNA na via intramuscular em animais, era capaz de ser endocitada por macrófagos e linfócitos B na medula óssea e linfonodos drenantes e por células dendríticas presentes principalmente nos linfonodos. Além disso, o trabalho demonstrou evidências de que os linfócitos B estavam envolvidos não somente na captura do DNA, mas também na expressão da proteína específica. Apesar da vacina DNAhsp65 ser injetada no músculo quadríceps do animal, o plasmídeo foi detectado em 6 órgãos analisados além do

músculo, incluindo o pulmão e os linfonodos drenantes, em até 6 meses após a administração (Coelho-Castelo, 2006). Estes achados reforçam, portanto, a idéia da existência de uma modulação específica desencadeada pela vacina no principal órgão alvo de *Mtb*, ou seja, no pulmão, assim como nos linfonodos, influenciando no desenvolvimento da resposta imune específica.

A ativação inicial dos linfócitos T após infecção por *Mtb* ocorre nos linfonodos (Wolf *et al.*, 2008). Neste local, também estão localizadas células da imunidade inata como as células NK e os linfócitos T $\gamma\delta$. Como mostrado em nosso trabalho, a vacinação dos animais com DNAhsp65 não exerce efeito significativo na população de células NK, NKT e T $\gamma\delta$ nos linfonodos drenantes (Figuras 21, 23 e 24). Neste órgão linfóide periférico, estas células constituem em torno de 1 a 2% dos linfócitos totais, sendo que suas subpopulações predominantes diferem daquelas encontradas no pulmão. No linfonodo, as subpopulações de NK apresentam proporção semelhante em torno de 30% (Figura 22), e interessante, a célula T $\gamma\delta$ de maior proporção é a CD27⁺ (Figura 25a), relacionada à produção de IFN- γ . Portanto, uma possível interpretação para esse achado é a de que no linfonodo, o principal papel associado às células T $\gamma\delta$ seja a produção de IFN- γ , que por sua vez, atuaria na diferenciação dos linfócitos para um padrão de resposta imune Th1.

As células T não convencionais estudadas em nosso trabalho foram descritas inicialmente como componentes da imunidade inata e que atuariam no período inicial de infecção contra um patógeno (Biron, 2010; Modlin & Sieling, 2005). Em nossas análises após 70 dias de infecção, ou seja, 10 dias após o fim do tratamento com a vacina DNAhsp65 e as drogas RIF e INH, verificamos diferenças significativas quanto às células analisadas no pulmão dos animais vacinados com DNAhsp65. As células NK e NKT não demonstraram alteração nas suas quantidades relativa e absoluta, mas sim quanto à sua funcionalidade. Células NK provenientes do pulmão dos animais vacinados com DNAhsp65 apresentaram maior expressão da molécula FasL (Figura 19), relacionada à morte celular induzida por apoptose. Este mecanismo favorece a morte de células infectadas e sua consequente captura por macrófagos, que juntamente com os mecanismos citotóxicos dos linfócitos e a autofagia constituem estratégias adicionais favoráveis à eliminação da micobactéria e que contornam a ineficiência de alguns macrófagos em mediar a morte da bactéria (Rook *et al.*, 2009). Além disso, o mecanismo de apoptose propicia maior controle da infecção por *Mtb* por constituir um processo de morte celular onde não ocorre a ruptura da membrana celular, ao contrário do que ocorre na necrose, sendo que este último mecanismo está relacionado à evasão da bactéria

da resposta imune do hospedeiro e contribui para o espalhamento da infecção (Behar *et al.*, 2011).

A ativação funcional das células NK nos animais do grupo DNAhsp65 pode ser interpretada como resultado da ativação direta da proteína HSP65, ou ainda, de forma indireta, como efeito da modulação da resposta imune local pela vacina. Em 1999, Multhoff *et al.* demonstraram que a HSP70 humana é capaz de estimular a proliferação e atividade citolítica das células NK. E que o reconhecimento da HSP pelas células NK seria mediado pelo receptor de ativação CD94 (Gross *et al.*, 2003). Além disso, dados da literatura têm associado a modulação exercida pelas vacinas de DNA à presença de motivos CpG na estrutura do DNA plasmidial. As células NK, por sua vez, podem ser ativadas indiretamente pelos motivos CpG, os quais após serem reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos, estimulam a secreção de citocinas como IFN- α/β , TNF- α e IL-12, que então ativam as células NK (Ballas *et al.*, 1996; Cowdery *et al.*, 1996).

Em estudos anteriores do grupo, já existiam evidências da participação de células NK no modelo de imunoterapia da TB experimental com a vacina DNAhsp65, assim como no protocolo de profilaxia da TB. Em 2001, Dos Santos observou em seu trabalho a modulação de células com fenótipo associado às células NK em animais infectados e vacinados com DNAhsp65 pela demonstração de que células mononucleares não aderentes do baço de animais imunizados com DNAhsp65 apresentavam maior expressão de marcadores de ativação como CD69 e CD122, além de maior atividade citotóxica contra as células alvo YAC-1. Neste estudo, apesar de não terem sido empregados marcadores específicos para identificação das células NK, os dados obtidos corroboram com os resultados deste trabalho, em que observamos uma mudança funcional das células NK nos animais infectados e vacinados com DNAhsp65, e não foram vistas alterações quanto às frequências relativa e absoluta destas células nestes animais.

Animais vacinados com DNAhsp65 também demonstraram alteração em relação às células T $\gamma\delta$ no pulmão. Estas células estavam aumentadas nestes animais (Figura 17a), assim como a expressão das citocinas: IFN- γ e IL-17 pelas mesmas (Figura 20). Em 1994, Silva *et al.* observaram a participação de células T $\gamma\delta$ no controle da infecção por Mtb em animais que receberam por transferência adotiva as células T $\gamma\delta$ provenientes de animais vacinados com macrófagos que continham o gene HSP65 de *M. leprae*. Outros dados não publicados do grupo também sugerem a participação das células T $\gamma\delta$ na imunidade protetora desencadeada pelo DNAhsp65 (Zárate-Bladés *et al.*, em preparação). Em 1990, Kabelitz *et al.*, descreveram

a existência de linfócitos T $\gamma\delta$ específicos para HSP65 de Mtb após infecção. Considerando a alta homologia entre a HSP65 de Mtb e de *M. leprae* e o aumento na frequência de células T $\gamma\delta$ observada em nossos resultados (Figura 17a), acredita-se que a imunização com DNAhsp65 possa desencadear uma resposta imune com aumento dessa população celular que, por sua vez, pode reconhecer antígenos relacionados a Mtb (incluindo a própria proteína homóloga HSP65) e após ativação, executa suas funções efetoras para combater a micobactéria. Além disso, assim como para as células NK, os linfócitos T $\gamma\delta$ também podem ser ativados indiretamente pelos motivos CpG presentes na vacina de DNA (Kunzmann *et al.*, 2004). Dessa forma, verifica-se que estas células são capazes de atuar não somente ao início da infecção, mas também numa etapa mais crônica da doença como consequência do estímulo vacinal.

Atualmente, vários trabalhos têm sido realizados na busca de biomarcadores que possam ser relacionados às diferentes fases da TB, e também como ferramenta para indicar cura de pacientes após tratamento eficaz, ou ainda como forma de prever a eficácia da vacinação anti-TB (Zárate-Bladés *et al.*, 2011). Isto porque o tratamento convencional da TB requer longo período de administração das drogas quimioterápicas associadas a diversos efeitos colaterais e pode não eliminar completamente a micobactéria. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa demonstrou em 2005, que a associação da vacina DNAhsp65 à quimioterapia convencional da TB estava envolvida na diminuição do tempo de tratamento, assim como na prevenção da reincidência da doença, e no tratamento eficaz de animais infectados com a cepa MDR (Silva *et al.*, 2005). Ainda nesse estudo, observou-se que animais tratados com as drogas apresentavam resposta predominantemente de perfil Th2 e diminuição de células citotóxicas. Considerando que a associação DNAhsp65 mais drogas demonstrou ter efeitos benéficos, aumentando inclusive a população de células de memória nos animais, investigamos no presente trabalho possíveis alterações sobre as células NK, NKT e T $\gamma\delta$ mediante o tratamento com as drogas ou na sua associação com a vacina DNAhsp65.

Dez dias após o fim do tratamento com as drogas RIF e INH e a vacina DNAhsp65, a quantidade de UFC no pulmão, baço e fígado dos animais estava abaixo do limite de detecção da técnica (Figura 9), indicando o efeito sistêmico dessas terapias na redução quase que total da carga bacilar nos grupos drogas e DNAhsp65-drogas. Em seguida, analisamos quais seriam os parâmetros imunológicos relacionados a este tratamento eficaz em nosso modelo experimental. No linfonodo destes animais, demonstramos que estava aumentado a subpopulação de NK: CD11b^{low}CD27^{high} (Figura 22). Ainda não se sabe ao certo o que

determina a migração das células NK para um determinado órgão e qual a implicação dos seus diferentes fenótipos em cada situação experimental (Shi *et al.*, 2011). A existência da subpopulação mais imatura ($CD11b^{low}CD27^{high}$) no linfonodo dos animais que obtiveram sucesso no tratamento da TB com as drogas convencionais e com a associação DNAhsp65-Drogas pode sugerir possível aumento na demanda de células NK nesse local. No entanto, no pulmão não verificamos diferença quanto às subpopulações de NK entre esses grupos (Figura 15). E, por sua vez, a subpopulação de T $\gamma\delta$ de maior frequência foi aquela de fenótipo $CD27^{+}$ (Figura 25), assim como nos animais vacinados com DNAhsp65, evidenciando a modulação mais para um perfil Th1 no linfonodo, sendo este ambiente essencial para a diferenciação das células deste local para esse perfil fortemente relacionado à proteção na TB.

Interessantemente, os animais tratados com drogas apresentaram maior frequência de células NK no pulmão (Figura 14). Este efeito já foi descrito em humanos que foram submetidos ao tratamento com as drogas convencionais da TB (Bozzano *et al.*, 2009). No nosso estudo também verificamos aumento na expressão do marcador de ativação CD69 e da citocina IL-10 nas células NK como influência da administração das drogas nos animais (Figura 19). Portanto, as células NK nos animais tratados com as drogas parecem apresentar perfil mais regulatório, relacionado à aparente resolução da infecção e reestabelecimento da homeostase pulmonar.

A associação da vacina DNAhsp65 às drogas quimioterápicas demonstrou ter efeito sobre a frequência da população de células T $\gamma\delta$ no pulmão (Figura 17a), aumentando a porcentagem destes linfócitos, no entanto estas células apresentavam nível de expressão das citocinas pró-inflamatórias menor que os animais somente infectados (Figura 20). Esta observação pode indicar que estas células expandiram durante a resposta imune para conter o microrganismo e permaneceram aumentadas até o dia analisado (dia 70). Enquanto isso, a subpopulação de célula T $\gamma\delta$ que expandiu com maior frequência no grupo drogas foi a de fenótipo $CD27^{+}$ (Figura 18b). De forma análoga, já foi verificado que em pacientes submetidos ao tratamento convencional da TB ativa, ocorria a reconstituição do número das células T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ e granulicina que se encontravam diminuídas antes do tratamento (Dieli *et al.*, 2001).

Dessa forma, nosso trabalho apresenta resultados que descrevem a modulação de distintas populações de células T não convencionais (NK, NK e T $\gamma\delta$), auxiliando na caracterização dos mecanismos imunes desencadeados após infecção por Mtb e imunoterapia com a vacina DNAhsp65, tratamento com as drogas ou com a associação das drogas à vacina

DNAhsp65. Pesquisas realizadas nesse sentido têm sido de grande importância para maior compreensão dos mecanismos imunes envolvidos nas patologias, em específico da TB, além de auxiliar no desenvolvimento de vacinas e quimioterapias que sejam mais eficazes do que as existentes atualmente.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

- O modelo de infecção intra-traqueal por Mtb (1×10^5 bacilos da cepa H37Rv) é capaz de modular as células NK, NKT e T $\gamma\delta$, aumentando a frequência absoluta dessas populações celulares no pulmão de camundongos BALB/c, assim como as respectivas subpopulações de células NK e T $\gamma\delta$ associadas a funções efectoras distintas;
- O tratamento da tuberculose experimental murina com DNAhsp65, drogas convencionais (RIF e INH) ou com a associação DNAhsp65-drogas, resulta na redução da carga bacilar, melhora do aspecto histopatológico pulmonar e na modulação associada de células NK e T $\gamma\delta$, mas não de NKT, aumentando diversos marcadores de ativação e moléculas efectoras incluindo CD69, IL-10 e FasL nas células NK dos grupos drogas, DNAhsp65-drogas e DNAhsp65 (somente FasL); e IFN- γ , IL-17 e T-bet nas células T $\gamma\delta$ do grupo DNAhsp65.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res.* 2008;42(1-3):219-32.
- Algood HM, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2005 Aug 1;41 Suppl 3:S189-93.
- Andoniou CE, Coudert JD, Degli-Esposti MA. Killers and beyond: NK-cell-mediated control of immune responses. *Eur J Immunol* 2008; 38:2938–42.
- Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol.* 1996 Sep 1;157(5):1840-5.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
- Barber DL, Mayer-Barber KD, Feng CG, Sharpe AH, Sher A. CD4 T cells promote rather than control tuberculosis in the absence of PD-1-mediated inhibition. *J Immunol.* 2011 Feb 1;186(3):1598-607. Epub 2010 Dec 20.
- Barnes PF, Samten B, Shams H, Vankayalapatib R. Progress in understanding the human immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2009 Dec;89 Suppl 1:S5-9.
- Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 1999 Jun 21;189(12):1973-80.
- Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan HX, Divangahi M, Remold HG. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* 2011 May;4(3):279-87. Epub 2011 Feb 9. Review.
- Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:535-62.

- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336. Review.
- Bento J, Silva AS, Rodrigues F, Duarte R. Diagnostic tools in tuberculosis. *Acta Med Port*. 2011 Jan-Feb;24(1):145-54. Epub 2011 Feb 28. Review. Portuguese.
- Beresford B, Sadoff JC. Update on research and development pipeline: tuberculosis vaccines. *Clin Infect Dis*. 2010 May 15;50 Suppl 3:S178-83.
- Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):131-42.
- Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol*. 2007 Jul;27(4):347-62.
- Biron CA. Expansion, maintenance, and memory in NK and T cells during viral infections: responding to pressures for defense and regulation. *PLoS Pathog*. 2010 Mar 26;6(3):e1000816. Review.
- Blumberg HM, Migliori GB, Ponomarenko O, Haldal E. Tuberculosis on the move. *Lancet*. 2010 Jun 19;375(9732):2127-9. Epub 2010 May 18.
- Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun*. 1998; 66(1):169-75
- Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A, Coelho-Castelo AA, Silva CL. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology*. 2004;113(1):130-8.
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):467-78. Epub 2010 Jun 11. Review.
- Borst J, van de Griend RJ, van Oostveen JW, Ang SL, Melief CJ, Seidman JG, Bolhuis RL. A T-cell receptor gamma/CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature*. 1987; 325(6106):683-8.

- Bozzano F, Costa P, Passalacqua G, Dodi F, Ravera S, Pagano G, Canonica GW, Moretta L, De Maria A. Functionally relevant decreases in activatory receptor expression on NK cells are associated with pulmonary tuberculosis in vivo and persist after successful treatment. *Int Immunol*. 2009 Jul;21(7):779-91. Epub 2009 May 21.
- Brill KJ, Li Q, Larkin R, Canaday DH, Kaplan DR, Boom WH, Silver RF. Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1755-65.
- Brenner MB, McLean J, Scheft H, Riberdy J, Ang SL, Seidman JG, Devlin P, Krangel MS. Two forms of the T-cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1987; 325(6106):689-94.
- Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):336-45.
- Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*. 1999 Nov 1;163(9):4647-50.
- Casetti R, Martino A. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cell Mol Immunol*. 2008 Jun;5(3):161-70.
- Chackerian AA, Perera TV, Behar SM. Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2001 Apr;69(4):2666-74.
- Choi HJ, Xu H, Geng Y, Colmone A, Cho H, Wang CR. Bacterial infection alters the kinetics and function of iNKT cell responses. *J Leukoc Biol*. 2008 Dec;84(6):1462-71. Epub 2008 Sep 4.
- Coelho-Castelo AA, Santos Júnior RR, Bonato VL, Jamur MC, Oliver C, Silva CL. B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. *Hum Gene Ther*. 2003 Sep 1;14(13):1279-85.
- Coelho-Castelo AA, Trombone AP, Rosada RS, Santos RR Jr, Bonato VL, Sartori A, Silva CL. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genet Vaccines Ther*. 2006 Jan 30;4:1.

- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998 Jun 11;393(6685):537-44. Erratum in: *Nature* 1998 Nov 12;396(6707):190.
- Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):413-25. Review.
- Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:393-422. Review.
- Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:641-76.
- Cosma CL, Humbert O, Sherman DR, Ramakrishnan L. Trafficking of superinfecting *Mycobacterium* organisms into established granulomas occurs in mammals and is independent of the Erp and ESX-1 mycobacterial virulence loci. *J Infect Dis*. 2008 Dec 15;198(12):1851-5.
- Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol*. 1996 Jun 15;156(12):4570-5.
- Culley FJ. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology*. 2009 Oct;128(2):151-63. Review.
- Curvo-Semedo L, Teixeira L, Caseiro-Alves F. Tuberculosis of the chest. *Eur J Radiol*. 2005 Aug;55(2):158-72.
- Dannenberg AM Jr, Collins FM. Progressive pulmonary tuberculosis is not due to increasing numbers of viable bacilli in rabbits, mice and guinea pigs, but is due to a continuous host response to mycobacterial products. *Tuberculosis (Edinb)*. 2001;81(3):229-42. Review.
- Das P, Horton R. Tuberculosis- time to accelerate progress. *Lancet*. 2010 May 22;375(9728):1755-7.

- Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*. 2009 Jan 9;136(1):37-49.
- Denis M. Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells toward *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes. *Cell Immunol* 1994; 156:529–36.
- Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Krensky AM, Bonneville M, Peyrat MA, Caccamo N, Sireci G, Salerno A. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis*. 2001 Oct 15;184(8):1082-5. Epub 2001 Sep 28.
- Dieli F, Ivanyi J, Marsh P, Williams A, Naylor I, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, Salerno A. Characterization of lung gamma delta T cells following intranasal infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):463-9.
- Doimo, Nayara Trevisan dos Santos. Avaliação da resposta auto-imune durante a imunoterapia da tuberculose com DNA-HSP65. Ribeirão Preto, 2010. Trabalho de conclusão de curso apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.
- Donoghue HD. Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jun;17(6):821-9.
- Dorhoi A, Kaufmann SH. Fine-tuning of T cell responses during infection. *Curr Opin Immunol*. 2009 Aug;21(4):367-77.
- Dos Santos, Sandra Aparecida. Atividade de células natural killer em animais vacinados ou tratados contra a tuberculose experimental com DNA-hsp65. Ribeirão Preto, 2001. Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.
- D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1997 Feb 1;158(3):1217-21.
- Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, Orlova MO, Apt AS. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun*. 2005 Mar;73(3):1744-53.

- Esin S, Batoni G, Counoupas C, Stringaro A, Brancatisano FL, Colone M, Maisetta G, Florio W, Arancia G, Campa M. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun*. 2008 Apr;76(4):1719-27.
- Feige U, Mollenhauer J. Heat shock proteins. Introduction. *Experientia*. 1992 Jul 15;48(7):621-2. Review.
- Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG, Cheever A, Hieny S, Young HA, Wynn TA, Sher A. NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):7086-93.
- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:93-129. Review.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):329-41.
- Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med*. 2003 Jul 21;198(2):267-79.
- Gallegos AM, Pamer EG, Glickman MS. Delayed protection by ESAT-6-specific effector CD4+ T cells after airborne *M. tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 2008 Sep 29;205(10):2359-68. Epub 2008 Sep 8.
- Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, Jensen P, Bayona J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*. 2010 May 22;375(9728):1830-43.
- Garg A, Barnes PF, Porgador A, Roy S, Wu S, Nanda JS, Griffith DE, Girard WM, Rawal N, Shetty S, Vankayalapati R. Vimentin expressed on *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6192-8.
- Ge N, Nishioka Y, Nakamura Y, Okano Y, Yoneda K, Ogawa H, Sugita A, Yanagawa H, Sone S. Synthesis and secretion of interleukin-15 by freshly isolated human bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 Nov;135(3):235-42.

- Gioia C, Agrati C, Goletti D, Vincenti D, Carrara S, Amicosante M, Casarini M, Giosue S, Puglisi G, Rossi A, Colizzi V, Pucillo LP, Poccia F. Different cytokine production and effector/memory dynamics of alpha beta+ or gamma delta+ T-cell subsets in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2003 Sep-Dec;16(3):247-52.
- Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev*. 2007 Dec;220:169-82. Review.
- Gross C, Hansch D, Gastpar R, Multhoff G. Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol Chem*. 2003 Feb;384(2):267-79.
- Grosset J. Studies in short-course chemotherapy for tuberculosis. *Chest* 1981; 80: 719–20.
- Grosset J. Present and new drug regimens in chemotherapy and chemoprophylaxis of tuberculosis. *Bull Int J Tuberc Lung Dis* 1990;2–3: 86–91.
- Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; Seder, R.A. 2000. DNA vaccines: immunology, application and optimization. *Ann. Rev. Immunol.*, v.18: p.927-974.
- Haas W, Tonegawa S. Development and selection of gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol*. 1992 Apr;4(2):147-55.
- Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, Grandien A, Ljunggren HG, Smyth MJ, Chambers BJ. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):123-9.
- Hayakawa Y, Huntington ND, Nutt SL, Smyth MJ. Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006 Dec;214:47-55. Review.
- Havlir DV, Barnes PF. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1999 Feb 4;340(5):367-73.
- Hirsch CS, Ellner JJ, Blinkhorn R, Toossi Z. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):3926-31.

- Jamil B, Shahid F, Hasan Z, Nasir N, Razzaki T, Dawood G, Hussain R. Interferon gamma/IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007 Jul;87(4):279-87. Epub 2007 May 29.
- Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1989 May 12;244(4905):713-6.
- Jiao L, Gao X, Joyee AG, Zhao L, Qiu H, Yang M, Fan Y, Wang S, Yang X. NK cells promote type 1 T cell immunity through modulating the function of dendritic cells during intracellular bacterial infection. *J Immunol*. 2011 Jul 1;187(1):401-11. Epub 2011 Jun 3.
- Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, Gupta RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol*. 1989; 9(5):2279-83.
- Jung YJ, Ryan L, LaCourse R, North RJ. Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Exp Med*. 2005 Jun 20;201(12):1915-24. Epub 2005 Jun 13.
- Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raulet DH, Turner J, Orme IM. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6039-45.
- Kabelitz D, Bender A, Schondelmaier S, Schoel B, Kaufmann SH.. A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65-kD heat shock protein. *J Exp Med*. 1990; 171(3):667-79.
- Kabelitz D, Bender A, Prospero T, Wesselborg S, Janssen O, Pechhold K. The primary response of human gamma/delta + T cells to *Mycobacterium tuberculosis* is restricted to V gamma 9-bearing cells. *J Exp Med*. 1991 Jun 1;173(6):1331-8.
- Kaufmann SH, Vth U, Thole JE, Van Embden JD, Emmrich F. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *Eur J Immunol*. 1987; 17(3):351-7.
- Kaufmann SH. The cellular immune response to heat shock proteins. *Experientia*. 1992; 48(7):640-3.

- Kaufmann SH, Schaible UE. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol.* 2005 Oct;13(10):469-75.
- Kaufmann SHE, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med* 2005;11 (suppl 4): S33–44)
- Kaufmann SH. Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. *Immunity.* 2010 Oct 29;33(4):567-77.
- Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. *Lancet.* 2010 Jun 12;375(9731):2110-9. Epub 2010 May 18. Review.
- Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009 Apr;21(4):317-37. Epub 2009 Feb 26. Review.
- Keller C, Hoffmann R, Lang R, Brandau S, Hermann C, Ehlers S. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. *Infect Immun.* 2006 Jul;74(7):4295-309.
- Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine.* 2008 Feb;41(2):79-83. Epub 2008 Jan 22. Review.
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975 Feb;5(2):112-7.
- Korbel DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect.* 2008 Jul;10(9):995-1004. Epub 2008 Aug 13.
- Kunzmann V, Kretzschmar E, Herrmann T, Wilhelm M. Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells via CD11c dendritic cell-derived type I interferons. *Immunology.* 2004 Jul;112(3):369-77.
- Kursar M, Koch M, Mittrücker HW, Nouailles G, Bonhagen K, Kamradt T, Kaufmann SH. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):2661-5.

- Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kaufmann SH. Protective role of gamma/delta T cells and alpha/beta T cells in tuberculosis. *Eur J Immunol*. 1995; 25(10):2877-81. Erratum in: *Eur J Immunol*; 25(12):3525.
- Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):495-502. Review.
- Lee BY, Horwitz MA. Identification of macrophages and stree-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*. 1995; 96(1): 245-9.
- Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4662-9.
- Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*. 1997; 15(8):834-8.
- Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*. 1999; 400(6741):269-71.
- Lukacs KV, Nakakes A, Atkins CJ, Lowrie DB, Colston MJ. In vivo gene therapy of malignant tumours with heat shock protein-65 gene. *Gene Ther*. 1997 Apr;4(4):346-50.
- Ma Z, Lienhardt C, McIlleron H, Nunn AJ, Wang X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet*. 2010 Jun 12;375(9731):2100-9. Epub 2010 May 18. Review.
- Maglione PJ, Xu J, Chan J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):7222-34.
- McDonough KA, Kress Y. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995 Dec;63(12):4802-11.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):428-35.

- Meraviglia S, Caccamo N, Salerno A, Sireci G, Dieli F. Partial and ineffective activation of V gamma 9V delta 2 T cells by *Mycobacterium tuberculosis*-infected dendritic cells. *J Immunol*. 2010 Aug 1;185(3):1770-6.
- Meraviglia S, El Daker S, Dieli F, Martini F, Martino A. $\gamma\delta$ T cells cross-link innate and adaptive immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:587315. Epub 2011 Jan 5.
- Michaluart P, Abdallah KA, Lima FD, Smith R, Moysés RA, Coelho V, Victora GD, Socorro-Silva A, Volsi EC, Zárate-Bladés CR, Ferraz AR, Barreto AK, Chammas MC, Gomes R, Gebrim E, Arakawa-Sugueno L, Fernandes KP, Lotufo PA, Cardoso MR, Kalil J, Silva CL. Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Gene Ther*. 2008 Oct;15(10):676-84. Epub 2008 Jun 6.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica – Tuberculose – 7º edição. Brasília, 2009.
- Mitchison DA. The action of antituberculosis drugs in short course chemotherapy. *Tubercle* 1985; 66: 219–25.
- Mittrücker HW, Kaufmann SH. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol*. 2004 Feb;34(2):306-12. Review.
- Modlin RL, Sieling PA. Immunology. Now presenting: gammadelta T cells. *Science*. 2005 Jul 8;309(5732):252-3.
- Moody DB, Zajonc DM, Wilson IA. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nat Rev Immunol*. 2005 May;5(5):387-99.
- Morais Fonseca D, Rosada RS, e Paula MO, Wowk PF, Franco LH, Soares EG, Silva CL, Deperon Bonato VL. Experimental tuberculosis: designing a better model to test vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010 Mar;90(2):135-42. Epub 2010 Feb 25.
- Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:957–64.
- Morita CT, Lee HK, Wang H, Li H, Mariuzza RA, Tanaka Y. Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human gamma delta T cells. *J Immunol*. 2001 Jul 1;167(1):36-41.

- Moser B, Eberl M. $\gamma\delta$ T-APCs: a novel tool for immunotherapy? *Cell Mol Life Sci.* 2011 Jul;68(14):2443-52.
- Multhoff G, Mizzen L, Winchester CC, Milner CM, Wenk S, Eissner G, Kampinga HH, Laumbacher B, Johnson J. Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol.* 1999 Nov;27(11):1627-36.
- Nembrini C, Marsland BJ, Kopf M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 May;123(5):986-94; quiz 995-6. Review.
- Niemann S, Rüscher-Gerdes S, Joloba ML, Whalen CC, Guwatudde D, Ellner JJ, Eisenach K, Fumokong N, Johnson JL, Aisu T, Mugerwa RD, Okwera A, Schwander SK. *Mycobacterium africanum* subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3398-405.
- Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Egualé T, Hiwot K, Aderaye G, Britton S. Circulating TNF- α , TGF- β , and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J Immunol.* 2001 Jan;53(1):85-91.
- Orme IM, Miller ES, Roberts AD, Furney SK, Griffin JP, Dobos KM, Chi D, Rivoire B, Brennan PJ. 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.* 1992 Jan 1;148(1):189-96.
- Paust S, Senman B, von Andrian UH. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev.* 2010 May;235(1):286-96. Review.
- Peres CM, de Paula L, Medeiros AI, Sorgi CA, Soares EG, Carlos D, Peters-Golden M, Silva CL, Faccioli LH. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2007 Apr;9(4):483-9. Epub 2007 Jan 21.
- Portaro FC, Hayashi MA, De Arauz LJ, Palma MS, Assakura MT, Silva CL, de Camargo AC. The *Mycobacterium leprae* hsp65 displays proteolytic activity. Mutagenesis studies indicate that the M. leprae hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HslVU protease. *Biochemistry.* 2002 Jun 11;41(23):7400-6.
- Potian JA, Rafi W, Bhatt K, McBride A, Gause WC, Salgame P. Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. *J Exp Med.* 2011 Aug 29;208(9):1863-74.

- Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):509-17. Review.
- Redford PS, Boonstra A, Read S, Pitt J, Graham C, Stavropoulos E, Bancroft GJ, O'Garra A. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur J Immunol*. 2010 Aug;40(8):2200-10.
- Ribeiro AM, Bocca AL, Amaral AC, Souza AC, Faccioli LH, Coelho-Castelo AA, Figueiredo F, Silva CL, Felipe MS. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine*. 2010 Feb 10;28(6):1528-34.
- Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, Girardi M, Borst J, Hayday AC, Pennington DJ, Silva-Santos B. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol*. 2009 Apr;10(4):427-36. Epub 2009 Mar 8.
- Rodrigues, Rodrigo Ferracine. Caracterização da expressão gênica e prospecção de biomarcadores induzidos pela associação entre o biofármaco DNAhsp65 e as drogas convencionais no tratamento da tuberculose experimental. Ribeirão Preto, 2011. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.
- Rook GA, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):661-7. Review.
- Rook GA, Hernández-Pando R, Zumla A. Tuberculosis due to high-dose challenge in partially immune individuals: a problem for vaccination? *J Infect Dis*. 2009 Mar 1;199(5):613-8.
- Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev*. 2005 Feb;203:38-47. Review.
- Rowland R, McShane H. Tuberculosis vaccines in clinical trials. *Expert Rev Vaccines*. 2011 May;10(5):645-58.
- Roy E, Lowrie DB, Jolles SR. Current strategies in TB immunotherapy. *Curr Mol Med*. 2007 Jun;7(4):373-86. Review.

- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.
- Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.* 2009 Sep;10(9):943-8. Epub 2009 Aug 19. Review.
- Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, Brenner MB, Behar SM. Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathog.* 2008 Dec;4(12):e1000239. Epub 2008 Dec 12.
- Santos-Junior RR, Sartori A, De Franco M, Filho OG, Coelho-Castelo AA, Bonato VL, Cabrera WH, Ibanez OM, Silva CL. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. *Hum Gene Ther.* 2005; 16(11):1338-45.
- Santos Júnior RR, Sartori A, Bonato VL, Coelho Castelo AA, Vilella CA, Zollner RL, Silva CL. Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression. *Clin Exp Immunol.* 2007 Sep;149(3):570-8.
- Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2007 Feb-Mar;85(2):103-11. Epub 2007 Jan 9.
- Saxena RK, Weissman D, Saxena QB, Simpson J, Lewis DM. Kinetics of changes in lymphocyte sub-populations in mouse lungs after intrapulmonary infection with *M. bovis* (Bacillus Calmette-Guerin) and identity of cells responsible for IFNgamma responses. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:405–10.
- Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med.* 2003 Aug;9(8):1039-46. Epub 2003 Jul 20.
- Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, Musella RM, Beigier-Bompadre M, Saab MA, Alves L, Abbate E, de la Barrera SS, Sasiain MC. Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy. *J Immunol.* 2005 Nov 15;175(10):6852-60.
- Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990 Apr 1;144(7):2771-80.

- Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med*. 2007 Sep 3;204(9):2159-69. Epub 2007 Aug 20.
- Sedlmayr P, Schallhammer L, Hammer A, Wilders-Truschnig M, Wintersteiger R, Dohr G. Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996 Aug;110(4):308-13.
- Shi FD, Ljunggren HG, La Cava A, Van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*. 2011 Sep 23;11(10):658-71.
- Silva CL, Silva MF, Pietro RC, Lowrie DB. Protection against tuberculosis by passive transfer with T-cell clones recognizing mycobacterial heat-shock protein 65. *Immunology*. 1994 Nov;83(3):341-6.
- Silva CL, Bonato VL, Coelho-Castelo AA, De Souza AO, Santos SA, Lima KM, Faccioli LH, Rodrigues JM. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *Gene Ther*. 2005 Feb;12(3):281-7.
- Silva CL, Bonato VL, dos Santos-Júnior RR, Zárate-Bladés CR, Sartori A. Recent advances in DNA vaccines for autoimmune diseases. *Expert Rev Vaccines*. 2009 Feb;8(2):239-52.
- Souza, Patrícia Rodrigues Marques. Modulação de células dendríticas com a proteína de choque térmico de 65 kDa, Ribeirão Preto, 2011. Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo.
- Stegelmann F, Bastian M, Swoboda K, Bhat R, Kiessler V, Krensky AM, Roellinghoff M, Modlin RL, Stenger S. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8 T cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2005, 175:7474–7483.
- Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Li CY, Nakayama T, Taniguchi M. Mycobacterial infection in natural killer T cell knockout mice. *Tuberculosis (Edinb)*. 2002;82(2-3):97-104.
- Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):557-61. Epub 2009 Jan 11. Erratum in: *Nature*. 2009 Feb 26;457(7233):1168.

- Sutherland JS, Jeffries DJ, Donkor S, Walther B, Hill PC, Adetifa IM, Adegbola RA, Ota MO. High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Nov;89(6):398-404. Epub 2009 Aug 14.
- Szalay G, Zügel U, Ladel CH, Kaufmann SH. Participation of group 2 CD1 molecules in the control of murine tuberculosis. *Microbes Infect*. 1999 Dec;1(14):1153-7.
- Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med*. 1996; 2(8):888-92.
- Thaiss CA, Kaufmann SH. Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. *Yale J Biol Med*. 2010 Dec;83(4):209-15.
- Tian T, Woodworth J, Sköld M, Behar SM. In vivo depletion of CD11c⁺ cells delays the CD4⁺ T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* and exacerbates the outcome of infection. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):3268-72.
- Torrado E, Robinson RT, Cooper AM. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol*. 2011 Feb;32(2):66-72. Epub 2011 Jan 6. Review.
- Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol*. 2009 Jun;85(6):905-10. Epub 2009 Mar 10.
- Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jun;5(6):405-17. Epub 2007 May 8. Review.
- Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM, Cooper AM. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6343-51.
- Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*. 2007 Mar 15;178(6):3786-96.
- van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RH, van der Meer JW. 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*. 2000 Mar;181(3):1194-7.

- Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, Griffith DE, Klucar P, Safi H, Girard WM, Cosman D, Spies T, Barnes PF. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol*. 2005 Oct 1;175(7):4611-7.
- Veenstra H, Baumann R, Carroll NM, Lukey PT, Kidd M, Beyers N, Bolliger CT, van Helden PD, Walzl G. Changes in leucocyte and lymphocyte subsets during tuberculosis treatment; prominence of CD3dimCD56+ natural killer T cells in fast treatment responders. *Clin Exp Immunol*. 2006 Aug;145(2):252-60.
- Venkataswamy MM, Baena A, Goldberg MF, Bricard G, Im JS, Chan J, Reddington F, Besra GS, Jacobs WR Jr, Porcelli SA. Incorporation of NKT cell-activating glycolipids enhances immunogenicity and vaccine efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*. 2009 Aug 1;183(3):1644-56.
- Victora GD, Socorro-Silva A, Volsi EC, Abdallah K, Lima FD, Smith RB, Moyses RA, Zárate-Bladés CR, Michaluart P, Silva CL, Kalil J, Coelho V. Immune response to vaccination with DNA-Hsp65 in a phase I clinical trial with head and neck cancer patients. *Cancer Gene Ther*. 2009 Jul;16(7):598-608. Epub 2009 Feb 6.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):503-10. Review.
- Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, Davis JM, Rawls JF, Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*. 2010 Jan 22;327(5964):466-9. Epub 2009 Dec 10.
- Vordermeier HM, Venkataprasad N, Harris DP, Ivanyi J. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. *Clin Exp Immunol*. 1996 Nov;106(2):312-6.
- Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2011 May;11(5):343-54. Epub 2011 Apr 8. Review.
- Wissinger E, Goulding J, Hussell T. Immune homeostasis in the respiratory tract and its impact on heterologous infection. *Semin Immunol* 2009; 21:147–55.
- Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med*. 2008 Jan 21;205(1):105-15. Epub 2007 Dec 24.

World Health Organization. WHO declares tuberculosis a global emergency [press release]. WHO, Geneva, Switzerland, 1993.

World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th ed.- WHO, Geneva, Switzerland, 2009.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control: WHO report 2010. WHO, Geneva, Switzerland, 2010.

Yoshimoto T, Paul WE. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1285-95.

Zárate-Bladés CR, Bonato VL, da Silveira EL, Oliveira e Paula M, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Fachin AL, Mello SS, Cardoso RS, Galetti FC, Coelho-Castelo AA, Ramos SG, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Silva CL. Comprehensive gene expression profiling in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* following DNAhsp65 immunotherapy. *J Gene Med*. 2009 Jan;11(1):66-78.

Zárate-Bladés CR, Silva CL, Passos GA. The impact of transcriptomics on the fight against tuberculosis: focus on biomarkers, BCG vaccination, and immunotherapy. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:192630. Epub 2010 Dec 20. Review.

Zorzella-Pezavento SF, Chiuso-Minicucci F, França TG, Ishikawa LL, Martins DR, Silva CL, Sartori A. Immunization with pVAXhsp65 decreases inflammation and modulates immune response in experimental encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(5):287-97. Epub 2010 Apr 17.