UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Comparação de diferentes sistemas de liberação
da vacina DNA-hsp65 na indução de proteção
contra tuberculose em cobaias**

Lúcia de Paula

Ribeirão Preto - SP

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Comparação de diferentes sistemas de liberação
da vacina DNA-hsp65 na indução de proteção
contra tuberculose em cobaias**

**Tese de Doutorado Apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, para Obtenção do Título de
Doutor em Biociências Aplicadas à
Farmácia, Área de Concentração:
Biociências Aplicadas à Farmácia**

Orientada: Lúcia de Paula

Orientadora: Dra. Lúcia Helena Faccioli

**Ribeirão Preto - SP
2006**

Autora: Lúcia de Paula

Título: Comparação de diferentes sistemas de liberação da vacina DNA-hsp65 na indução de proteção contra tuberculose em cobaias

Profa Dra Lúcia Helena Faccioli

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Trabalho defendido e aprovado pela comissão julgadora em ____/____/2006.

Paula, Lúcia de

Comparação de diferentes sistemas de liberação da vacina DNA-hsp65 na indução de proteção contra tuberculose em cobaias. Ribeirão Preto, 2006.

96 p.: il.; **30 cm.**

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Vacina de DNA. 3. tuberculose. 4. inflamação. 5. proteção.

Trabalho realizado no Centro de Pesquisa em Tuberculose do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli, com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo 03/1145-0).

“Platão achava que tudo o que vemos ao nosso redor na natureza, tudo o que podemos tocar pode ser comparado a uma bolha de sabão. Pois nada do que existe no mundo dos sentidos é duradouro. Também é sua opinião que nunca podemos chegar a conhecer verdadeiramente algo que se transforma. Não podemos ter senão opiniões incertas sobre tudo o que sentimos ou percebemos sensorialmente. Mas podemos chegar a um conhecimento seguro sobre aquilo que reconhecemos como nossa razão. A soma dos ângulos de um triângulo é 180°. E assim será por toda a eternidade. Da mesma forma, a idéia de que um cavalo terá sempre quatro patas continuará válida, ainda que todos os cavalos do mundo dos sentidos fiquem mancos de uma perna.

Quando você vê uma sombra, na mesma hora você pensa que alguma coisa deve estar projetando esta sombra. Por exemplo, pode acontecer de você ver a sombra de um animal. Talvez a de um cavalo, mas você não está bem certa. Então você se vira e vê o animal verdadeiro, que, naturalmente é muito mais bonito e de contornos muito mais nítidos do que a imprecisa sombra. É por isso que Platão considera todos os fenômenos da natureza meros reflexos das formas eternas, ou idéias. Só que a maioria das pessoas está satisfeita com sua vida em meio a esses reflexos sombreados. Elas acreditam que as sombras são tudo o que existe, e por isso não as vêem como sombras”.

Trecho do livro “O Mundo de Sofia – Romance da história da filosofia” de Jostein Gaarder

Dedicatória

Dedico esta tese,

Aos meus pais, Maria Aparecida e José Valdir, anjos que me deram a vida, me ensinaram os primeiros passos e que continuam me confortando e guiando sempre, com toda sua dedicação e amor imensurável.

À minha filha Rafaela, que com sua existência me fortalece a cada momento e me permite ver a vida com um pouco mais de delicadeza.

À minha irmã Luciana e meu cunhado Marcelo pelo ombro amigo, incentivo, carinho e solidariedade em muitos momentos difíceis.

Ao meu sobrinho e afilhado Marcos Vinícius pela alegria de seu sorriso que preenche meu coração e ao meu sobrinho Augusto, ainda a caminho, por vir fazer parte desta família.

Agradecimientos

Meus sinceros agradecimentos,

À Deus, por permitir a realização deste trabalho e por sempre me mostrar os melhores caminhos a serem seguidos.

À Prof. Dra. Lúcia, com muita gratidão, por ter me ensinado os primeiros passos na profissão, gostaria de dedicar cada trecho deste trabalho, permeado por todo seu carinho, disposição e competência, e agradecer os instantes de esperança que me fizeram persistir e levar adiante um projeto fundamental para minha carreira e vida.

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, pelas portas abertas de seu laboratório e material gentilmente concedido, possibilitando a execução deste trabalho, pelas discussões e sugestões valiosas, pela sincera atenção com que sempre me recebeu e pelo exemplo de pesquisador.

Ao extraordinário profissional da área de psiquiatria Dr. Guido Hetem que me ajudou com a terapia a superar um período extremamente difícil e a enfrentar a vida de frente, porém com mais sutileza.

Ao Prof. Edson Garcia Soares pelo olhar atento na interpretação dos resultados de histologia e à Ana pela dedicação e confecção das lâminas histológicas.

À Profa. Dra. Beatriz Rosseti Ferreira pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a realização dos ensaios de PCR, pela credibilidade e atenção com que sempre me recebeu.

À Profa. Dra. Adriana Malheiro, minha fada-madrinha de laboratório, que me ensinou muito com sua humanidade, ternura, firmeza e ética.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a análise da morfometria das lesões pulmonares e pelo exemplo de profissional.

A Dra. Luciana Leite do Butantan, pelo fornecimento da vacina BCG.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, pela amizade, apoio e ensinamentos de entusiasmo.

À Profa. Dra. Christie por ceder o espaço para acomodação dos animais durante a reforma do biotério da FCFRP.

Aos docentes da FCFRP e da FMRP pelo conhecimento transmitido.

À minha amiga Daniela Carlos, sempre prestativa, por tudo em que me auxiliou desde os experimentos infinitos como também pelas conversas sinceras e palavras de esperança.

À minha amiga Camila, pela amizade, confiança e incentivo constante e pelo auxílio nos experimentos, inclusive os das madrugadas.

À minha amiga Eleuza, por me auxiliar a ver e respeitar as falhas do ser humano de forma mais branda e por sempre me depositar confiança.

À minha amiga Érika pela prestatividade, carinho, compreensão que tanto me ajudou sempre..

Ao Carlos pela colaboração e dedicação nos experimentos e pelos momentos divertidos no laboratório.

Aos amigos do laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Adriana Seccato, Alexandra, Alexandre, Anderson, Carlos, Caroline, Daniela Isabel, Fabiani, Fernanda, Karoline, Patrícia, Rosane, Roberto e Walter, pela amizade, carinho, companheirismo, apoio pessoal e por acreditarem em mim.

Aos amigos do laboratório na Faculdade de Medicina, Ana Paula (PAT), Ana Olívia, Beraba, Carlos Rodrigo, Cássia, Deison, Denise, Fábio, Giovanna, Juliana, Marina, Patrícia, Pryscilla, Rogério, Rubens, Tatiana e Thiago, pela amizade, solidariedade, companheirismo e agradável convívio.

À Adriana, Bruna e Nadiele pela amizade e apoio no laboratório.

A Cláudia E. Passoni, pelo paciência e dedicação com que me ensinou as PCRs, pela amizade e carinho.

A Alessandra M. Franzin, pelo auxílio nos experimentos de PCR e pela convivência agradável.

À Sandra Santos pela amizade e disposição em auxiliar e também por me ceder a proteína recombinante para os experimentos.

À Karla Lima pelo carinho, atenção e disponibilidade de auxílio na obtenção das microesferas.

À Sheila, sempre prestativa e disponível a auxiliar nos cuidados com os animais mantidos na P3.

Às técnicas de laboratório, Iza e Ana Paula (PAM), pela amizade, eficiência e disponibilidade de auxílio no laboratório e palavras reconfortantes nos momentos de desespero.

Aos amigos Daniela, Cláudio, Alexandre, Cristina, Sandra, Kelen, Clever, Cláudia, Luciano, Flávia e Vânia, companheiros de orgias gastronômicas e pelos momentos de descontração, conversas, apoio e amizade, alegrias e tristezas compartilhadas.

Ao amigo Wladimir pelas conversas filosóficas que me fortalecem e aumentam o ângulo de visão.

A amiga Cristiane, que sempre me incentivou com seu carinho, confiança, ternura e companheirismo.

Ao Paulo e ao Henrique, pela atenção com que sempre me receberam e auxiliaram na aquisição das imagens.

A equipe da Nanocore, Júnior, Viviane, Sílvia, Domingos e Carol, pelo apoio e agradável convívio.

Aos vigias da FCFRP, Sr. Antônio e Sr. João por zelarem pela segurança dia e noite.

Aos meninos do biotério, Aldo e Reinaldo, pelo bom-humor com que sempre me receberam e pelo cuidado e dedicação que sempre tiveram com os animais empregados neste trabalho.

Aos integrantes da seção de pós-graduação pelos momentos de apoio.

As técnicas Toninha e Tita pelo auxílio na lavagem dos materiais, por zelarem pelo nosso laboratório e pelo agradável convívio.

As meninas da Faísca, pelo cuidado com a ordem e limpeza do laboratório e pelo sorriso sempre presente no rosto.

Aos demais amigos, docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela vivência que tanto contribuiu para meu enriquecimento profissional e que muitas lições de vida me transmitiram.

A FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos aqueles, que mesmo não mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sendo gente. Conviver gera problemas e atritos mas também crescimento pessoal

Resumo

RESUMO

PAULA, L. Comparação da BCG e diferentes sistemas de liberação da vacina DNA-hsp65 na indução de proteção contra tuberculose em cobaias. 2006. 96f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2006.

As grandes mudanças para os pesquisadores da área de vacinas são a otimização das vacinas de DNA para uso em humanos ou animais de grande porte e criar vacinas efetivas de uma única dose usando sistemas de liberação controlada apropriados. O plasmídeo de DNA codificando a proteína de *heat-shock* 65 (hsp65) (DNA-hsp65) foi capaz de induzir resposta imune protetora e terapêutica no modelo murino da tuberculose (TB). Apesar do sucesso da vacina baseada na DNA-hsp65 em solução para proteger camundongos contra TB, esta requer múltiplas doses de grande quantidade de DNA para imunização efetiva. No intuito de otimizar esta vacina e simplificar o protocolo de vacinação, nós co-encapsulamos DNA-hsp65 e o adjuvante dimicolato de trealose (DMT) em microesferas biodegradáveis de ácido polilático-poliglicólico (PLGA) para uma única administração. Além disso, foi também desenvolvida uma formulação *prime-boost* da vacina de dose única baseada na mistura de duas diferentes microesferas de PLGA, apresentando liberação rápida e lenta, de DNAhsp65 e proteína hsp65 recombinante, respectivamente. Essas formulações foram testadas em cobaias pela comparação da eficácia protetora (componentes efetores da imunidade protetora) e toxicidade (componentes efetores da patologia) induzida pela preparação da preparação do DNA em solução ou BCG. A formulação de dose única *prime-boost* nitidamente apresentou maior eficácia e reduziu a patologia nos pulmões de cobaias.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, vacina de DNA, tuberculose, inflamação, proteção.

Abstract

ABSTRACT

PAULA, L. Comparison of BCG and different delivery systems of DNA-hsp65 vaccine for the induction of protection against tuberculosis in guinea pigs. 2006. 96f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2006.

The great challenges for researchers working in the field of vaccinology are optimizing DNA vaccines for use in humans or large animals and creating effective single-dose vaccines using appropriated controlled delivery systems. Plasmid DNA encoding the heat-shock protein 65 (hsp65) (DNAhsp65) has been shown to induce protective and therapeutic immune responses in a murine model of tuberculosis (TB). Despite the success of naked DNAhsp65-based vaccine to protect mice against TB, it requires multiple doses of high amounts of DNA for effective immunization. In order to optimize this DNA vaccine and simplify the vaccination schedule, we coencapsulated DNAhsp65 and the adjuvant trehalose dimycolate (TDM) into biodegradable poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres for a single dose administration. Moreover, a single-shot prime-boost vaccine formulation based on a mixture of two different PLGA microspheres, presenting faster and slower release of, respectively, DNAhsp65 and the recombinant hsp65 protein was also developed. These formulations were tested in guinea pigs by comparison with the efficacy (effector components of protective immunity) and toxicity (effector components of pathology) induced by the naked DNA preparation or BCG. The single-shot prime-boost formulation clearly presented good efficacy and diminished lung pathology in guinea pigs.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, DNA vaccine; tuberculosis; inflammation, protection.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que representa um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública no mundo (WHO, 2000). Na sua marcha desafiadora, estima-se que a TB atingiu, nos tempos atuais, dez milhões de novos casos e três milhões de mortes por ano, sendo 18,5% de todas as mortes em adultos entre 15-59 anos - a fase mais produtiva da população mundial. Cerca de metade dos doentes nunca tiveram tratamento (WHO, 2000). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que 32% da população mundial está infectada com o bacilo causador da TB e pode adoecer por reativação ou infecção exógena. Entre 1850 e 1950, um bilhão de pessoas morreram de TB. Entre 1990 e 1999, 300 milhões de pessoas foram infectadas, surgiram 90 milhões de novos casos da doença e 30 milhões de pessoas morreram de TB (DYE et al., 1999).

O conhecimento sobre a dinâmica dessa doença tem como marco a identificação do bacilo *M. tuberculosis* (Mtb) por Robert Koch, em 1882. A TB é causada primariamente pelo Mtb (bacilo de Koch), entretanto em muitas partes do mundo uma quantidade significativa da doença é também devida à infecção por organismos altamente relacionados como *M. africanum* e *M. bovis*. Juntamente com espécies de menor importância, esses organismos são coletivamente referidos como complexo *M. tuberculosis*. Estudos genômicos recentes têm mostrado que a vasta maioria de genes destas espécies são idênticos, ou muito similares, e que diferenças mais intensas entre espécies e linhagens são inserções e deleções de DNA codificando um ou pequeno número de genes (COLE, 1998). Embora a significado funcional dessas

diferenças, bem como as diversas substituições de nucleotídeos ocorridas entre espécies ainda não tenham sido esclarecidas, muitas destas podem resultar em alterações na patogenicidade observada entre espécies e linhagens distintas (FLEISCHMANN et al., 2002).

O advento da quimioterapia, baseada nos antibióticos, com índice esperado de cura de até 95% dos casos, fez com que originasse uma euforia pela possível erradicação definitiva da "peste branca", como foi conhecida a TB por longo tempo. No entanto, as especificidades dessa doença, freqüentemente associadas à pobreza, mudaram o quadro de euforia para um cenário de recrudescimento do flagelo, inclusive indicando perspectivas muito preocupantes se negligenciadas medidas adequadas de ações de controle. Tal situação agrava-se com o aparecimento de bacilos resistentes às diversas drogas (MDR), geralmente resultantes de tratamentos irregulares e com grandes percentuais de abandono (MITCHISON, 1985).

Apesar das estatísticas mostrarem que grande parte da população mundial entrou em contato com o bacilo, uma parcela relativamente pequena desenvolve a doença. A maioria dos indivíduos infectados (90%) desenvolve a forma latente e assintomática da doença. Uma pequena porcentagem dessas pessoas (cerca de 10%) pode apresentar reativação da infecção, geralmente como consequência de uma infecção secundária, imunossupressão, desnutrição, consumo alcoólico, condições sanitárias precárias ou elevado grau de exposição, podendo desenvolver a TB ativa. Raramente, a doença progride logo após a infecção primária (5-10% dos casos) (FLYNN & CHAN, 2005; BOOM et al., 2003).

Diversos modelos animais têm sido utilizados na pesquisa da TB, e características específicas ao modelo experimental têm uma profunda influência no desenvolvimento dos experimentos. Enquanto algumas vacinas são altamente protetoras em determinado modelo, em outro são completamente ineficazes em um ou mais parâmetros. Os modelos animais de TB pulmonar utilizando cobaias, camundongos e coelhos têm sido extremamente empregados (McMURRAY, 1996). Apesar de camundongos, cobaias e coelhos terem sido utilizados como modelos reprodutíveis da TB pulmonar, existem algumas vantagens e desvantagens peculiares à cada animal. Estes experimentos devem ser realizados em cabines de segurança biológica nível 3 (BL-3), e requerem espaço adequado para o animal pesquisado e conseqüentemente influenciando a complexidade logística e o custo da pesquisa (revisto por McMURRAY et al., 2001). Camundongos têm uma clara vantagem neste aspecto, devido ao menor espaço que ocupam em relação às cobaias e aos coelhos, e o menor custo de obtenção e manutenção. Além disso, o sistema imunológico murino é bem mais caracterizado, com numerosos reagentes comerciais disponíveis para manipular e avaliar os mecanismos antimicobacterianos (ORME & COLLINS, 1994). Além disso, a deleção de genes realizada em camundongos tem demonstrado funções essenciais de várias citocinas e tipos celulares na resistência à TB. Por outro lado, camundongos são mais resistentes à infecção com *Mtb*, e conseguem manter altos níveis de micobactérias em seus pulmões sem doença aparente por meses. Além disso, o desenvolvimento da doença em camundongos difere significativamente da TB humana. Os granulomas de camundongos raramente

progridem para necrose, caseação e liquefação como muitas vezes ocorre em humanos (McMURRAY et al., 2001). Finalmente, a reação de hipersensibilidade tardia (DTH) desenvolvida após inoculação de tuberculina na pele não pode ser estudada em camundongos (McMURRAY et al., 2001). Apesar dos coelhos serem extremamente susceptíveis à infecção com *M. bovis*, os mesmos são mais resistentes à infecção com *Mtb*. Em termos de obtenção, manutenção e quantidade de espaço necessário em BL-3, coelhos são os animais mais caros dos três citados acima, embora reproduzam de modo fidedigno a totalidade de conseqüências patológicas observadas na TB humana. Granulomas pulmonares em coelhos rapidamente progridem à liquefação, e este é o melhor modelo para estudo do processo de cavitação. Além disso, a DTH em coelhos infectados é uma reprodução acurada da resposta dérmica ocorrida em humanos infectados. No entanto, os reagentes para citocinas de coelhos são extremamente raros (ORME & McMURRAY, 1996).

A cobaia é o modelo clássico de Koch para TB (McMURRAY, 1994). São extremamente susceptíveis à infecção com *Mtb*. O progresso da infecção em cobaias pode resultar da implantação de um único bacilo tuberculóide virulento e teoricamente todas as cobaias infectadas podem eventualmente morrer da doença. A disseminação extrapulmonar de micobactérias através da drenagem linfática para o sangue tem sido extensivamente estudada neste modelo. Os granulomas pulmonares que se desenvolvem subsequente à exposição via baixas doses da bactéria por aerosol, mimetizam tubérculos humanos com todas as características importantes, exceto cavitação, que raramente ocorre

em outras espécies. A DTH de cobaias infectadas a antígenos micobacterianos é quase idêntica – a olho nu e microscopicamente – às reações humanas à tuberculina. Cobaias podem ser protegidas sucessivamente com BCG e outras vacinas experimentais, e respondem muito bem à terapia oral com drogas quimioterápicas clássicas. Recentemente, vários genes de citocinas e quimiocinas de cobaias têm sido clonados, e alguns reagentes estão sendo desenvolvidos para estudo dos determinantes imunológicos da resistência à TB neste modelo (McMURRAY et al., 2001).

O bacilo Mtb é uma micobactéria intracelular facultativa de crescimento lento que reside e multiplica-se no interior de fagócitos mononucleares do hospedeiro (NOLTE & METCHOCK, 2000). A transmissão da TB ocorre através da inalação de partículas, contendo a bactéria, que são expelidas em forma de aerosol por indivíduos com a doença ativa (RILEY et al., 1959). Os bacilos também podem por sua vez permanecer por algum tempo no ambiente, por serem resistentes à dissecação, possibilitando a transmissão da doença para outros indivíduos (RILEY et al., 1959). Entretanto, o estabelecimento da infecção depende do número de bacilos inalados, da duração da exposição ao bacilo, da virulência da cepa, além das condições imunológicas e características genéticas do indivíduo exposto (DANNENBERG, 1989). Apesar da resistência natural presente na maior parte dos indivíduos infectados, cerca de 5 a 10% das pessoas desenvolvem a doença pulmonar ativa durante a vida (CHACKERIAN et al., 2001).

O estabelecimento da infecção pelo Mtb nos pulmões depende do encontro do bacilo com as células do hospedeiro, geralmente macrófagos

alveolares ou células dendríticas (HINDLEY-WILSON, 2000). Após a fagocitose, a maioria dos bacilos é degradada no interior dos fagolisossomos pelas enzimas lisossomais (HINDLEY-WILSON, 2000). A presença dos bacilos remanescentes e dos produtos resultantes da degradação de micobactérias ativam macrófagos alveolares, que secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8, MCP-1, MCP-3, IP10, RANTES, MIP1 α e MIP2, recrutando leucócitos para o local da infecção. Inicialmente, ocorre a migração de neutrófilos para o sítio da infecção e em seguida monócitos e precursores de células dendríticas (KAUFMANN, 2003; FLYNN & CHAN, 2001; DANNENBERG, 1993; ADAMS, 1976). Além disso, os macrófagos também ativam a resposta imune adaptativa e atuam como células apresentadoras de antígenos. Como funções microbidas, os macrófagos liberam enzimas lisossomais e produzem intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio (FLYNN & CHAN, 2005; BROWN & TAFFET, 1995; CLEMENS & HORWITZ, 1993). Pelo fato de alojarem os bacilos em seu interior e exercerem funções microbidas, os macrófagos são essenciais na indução da resposta imune contra TB. Porém sua ativação no início da infecção é geralmente insuficiente para eliminar estas bactérias e controlar a infecção, fazendo-se necessário ativar a resposta imune celular específica, principalmente mediada por linfócitos T (FLYNN & CHAN, 2005; SILVA et al., 1994; CLEMENS & HORWITZ, 1993). Apesar dos mecanismos microbidas que levam à destruição de patógenos, os bacilos desenvolveram estratégias que permitem sua sobrevivência no interior de células hospedeiras, como a inibição da fusão do endossomo ao lisossomo (RUSSEL, 1995), num mecanismo possivelmente

dependente da presença de glicolípídeos da superfície da micobactéria, como o dimicolato de trealose (SPARGO et al., 1991; LIMA et al., 2003). Em indivíduos susceptíveis, infecções micobacterianas induzem intensa resposta de hipersensibilidade tipo IV, que resulta na formação de granulomas na fase crônica da infecção através do recrutamento de PMN, células mononucleares e linfócitos, que têm a finalidade de circunscrever o bacilo (NAU et al., 1997; BEAN et al., 1999; SEILER et al., 2003). Os granulomas são formados por uma área central de necrose circundada por macrófagos infectados, linfócitos T CD_4^+ e T CD_8^+ em menor quantidade, e pequeno influxo de linfócitos B distribuídos periféricamente. Algumas vezes, macrófagos infectados fundem-se e formam células gigantes (DANNENBERG, 1993; ADAMS, 1976). Os bacilos, uma vez delimitados pelas células inflamatórias recrutadas, permanecem em estado latente, conservando a capacidade de replicação e disseminação. Caso estes indivíduos tornem-se imunodeficientes, por diferentes razões, provavelmente ocorrerá a desorganização dos granulomas e a liberação dos bacilos para diferentes tecidos e para o ambiente, levando à reativação da infecção e à doença ativa (SILVA et al., 2001).

Estudos sobre o papel de citocinas na tuberculose vêm sendo amplamente realizados, com o objetivo de avaliar as funções destas no recrutamento das células para o foco inflamatório, nos mecanismos de defesa do hospedeiro e na imunopatologia, como ferramenta para o desenvolvimento de vacinas efetivas contra a TB (LIMA et al., 2001; FLYNN, 2004). A resposta inflamatória após infecção pelo Mtb é caracterizada pela liberação de $TNF-\alpha$, o qual está associado ao recrutamento de polimorfonucleares e fagócitos

mononucleares (TOOSSI et al., 2000). O TNF- α modula a migração celular, influenciando a expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, e contribui com a formação e manutenção do granuloma (NAU et al., 1997). Durante a tuberculose ativa, o aumento da produção de citocinas como, IL-1, IL-6 e TNF- α por células do lavado bronco-alveolar está relacionado ao controle da infecção e à indução de resposta imune específica, como a formação do granuloma (LAW et al., 1996). Também, Saunders e colaboradores (2000) mostraram que camundongos sem o gene funcional de IL-6 (IL-6 KO) infectados com Mtb apresentaram aumento da recuperação de bacilos nos pulmões, baço e fígado e produção tardia de IFN- γ , quando comparado com camundongos normais. No entanto, a ausência de IL-6 não foi essencial para o desenvolvimento de memória imunológica contra o Mtb. Vários trabalhos demonstraram o papel de citocinas do padrão de resposta imune Th1, como IFN- γ , TNF- α e IL-12 na proteção contra a TB. Macrófagos peritoneais murinos incubados com Mtb produzem grandes quantidades de TNF- α e IFN- γ (FLESCHE & KAUFMANN, 1987). Estas citocinas agem em sinergismo, aumentando os mecanismos microbicidas dos macrófagos, como a produção de intermediários do nitrogênio por estas células (DING et al., 1988). Outra importante citocina envolvida na resposta protetora na TB é a IL-12, liberada por macrófagos e células dendríticas após a fagocitose dos bacilos. A produção de IL-12 estimula a produção de IFN- γ por outras células, como os linfócitos T CD₄⁺ e T CD₈⁺, as células “natural killer” (NK) e os próprios macrófagos infectados (FENTON et al., 1997). A produção de IFN- γ é essencial para ativação dos macrófagos e tem um papel crucial no controle da infecção

pelo Mtb micobactéria (COOPER et al., 1993; FLYNN et al., 1993). Também, FLYNN e colaboradores (1995) mostraram que a administração exógena de IL-12 em camundongos infectados com Mtb aumenta a sobrevivência dos animais. Posteriormente, LOWRIE e colaboradores (1999) demonstraram que a administração da vacina gênica que codifica a IL-12 reduziu significativamente o número de bacilos nos pulmões de camundongos durante a infecção crônica induzida pelo Mtb.

O tratamento da TB é realizado com o uso de diferentes antibióticos por no mínimo seis meses. O longo período de tratamento e os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados acabam resultando no abandono do mesmo. Por outro lado, a profilaxia da TB é realizada pela administração da vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin) que foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin no Instituto Pasteur entre 1906 e 1919 (CHUNG & BIGGERS, 2001; BANNON, 1999). Essa vacina é uma cepa virulenta de *M. bovis* que foi atenuada através do cultivo do bacilo *in vitro* por vários anos. Estima-se que mais de três bilhões de doses da vacina BCG foram administradas em todo o mundo (FINE, 1989). Apesar da relativa segurança e baixo custo da vacina BCG, sua eficácia é altamente variável (FINE, 1989). A variabilidade na proteção conferida pela BCG está associada a vários fatores, tais como o contato prévio com micobactérias ambientais (principalmente nas regiões tropicais), características genéticas da população vacinada, inexistência de padronização da produção da BCG e a perda de segmentos gênicos durante as sucessivas culturas do bacilo (HESS & KAUFMANN, 1999).

Embora exista a vacina BCG e também medicamentos para a terapia de indivíduos doentes, alguns fatores estão associados ao elevado número de casos de TB, como o abandono da quimioterapia, o surgimento de novas cepas MDRs e a eficácia variável da BCG (WHO, 2005). Esse contexto levou a necessidade do desenvolvimento de uma nova vacina contra TB, que seja mais eficiente e segura que a BCG e possa ser empregada em indivíduos imunocomprometidos. Nos últimos anos foram testadas mais 170 vacinas experimentais contra a TB, baseadas em microorganismos vivos recombinantes ou proteínas, em diferentes modelos animais, muitas das quais estão em fase de ensaio clínico (REED & LOBET, 2002; GINSBERG, 2002).

As *heat shock proteins* (HSPs) desempenham diversas funções celulares tais como ligação à outras proteínas e transporte no retículo endoplasmático e citoplasma, atuando como chaperonas. Essas proteínas são produzidas em grande quantidade durante apoptose, infecções virais, inflamação e em transplantes. Assim, de um modo geral as HSPs atuam como sinal de perigo e levam à ativação da resposta imune inata (revisto por TODRYK et al., 2000). Além disso, essas proteínas têm sido descritas como fator de virulência de diversos microrganismos (LEWTHWAITE et al., 1998). Diversos epítomos das moléculas HSPs foram descritos em *Mtb* e *M. leprae* (MUSTAFA et al., 1996, 1999), porém a proteína hsp65 é um antígeno imunodominante (KAUFMANN et al., 1987).

Dentro desse cenário, o Instituto do Milênio REDE-TB, juntamente com o Centro de Pesquisas em Tuberculose da FMRP-USP vêm dando sua parcela de contribuição na busca de alternativas de prevenção ou tratamento para a

TB. Inicialmente, foi demonstrado que macrófagos murinos J774, transfectados com um vetor retroviral contendo a região genômica do gene hsp65 de *M. leprae*, são capazes de conferir proteção contra desafios com *M. bovis* BCG ou Mtb H37Rv em camundongos BALB/c (SILVA et al., 1994). Em uma série de trabalhos subsequentes foi demonstrado que células T CD₄⁺ e T CD₈⁺ estão envolvidas na resposta protetora (SILVA et al., 1996). Posteriormente, injeções intramusculares de vacinas de DNA (plasmídeos pcDNA₃ e pHMG recombinantes contendo a mesma região genômica de hsp65) também levaram à produção de anticorpos específicos e respostas celulares contra a proteína (LOWRIE et al., 1994), corroborando os dados anteriores obtidos com macrófagos transfectados. Além disso, animais imunizados com plasmídeos expressando hsp65 foram mais resistentes à infecção com Mtb (LOWRIE et al., 1997; BONATO et al., 1998). Posteriormente, foi demonstrado que esta vacina apresenta também atividade terapêutica, podendo ser utilizada para o tratamento da tuberculose (LOWRIE et al., 1999). Assim, entre todas as vacinas de DNA testadas, a que codifica a proteína de estresse HSP65 de *M. leprae*, tem a propriedade de: (i) prevenir o estabelecimento da infecção e da doença; (ii) eliminar a infecção causada pelo bacilo Mtb e curar casos crônicos da doença disseminada; (iii) curar casos de TB induzida por bactérias altamente resistentes aos medicamentos usados no combate à doença; e (iv) impedir a reativação da doença quando os animais são submetidos a uma imunodepressão pelo tratamento com corticosteróides (LOWRIE et al., 1999).

Embora esteja bem estabelecido o efeito benéfico da vacina DNA hsp65 em camundongos, ainda não se sabe os efeitos da administração desta vacina

em cobaias que são animais susceptíveis à infecção. Além disso, por se tratar de uma infecção de caráter crônico, a maioria dos estudos relacionados com infecções provocadas por micobactérias se concentra na participação e ativação das subpopulações de linfócitos T e dos macrófagos. Além disso, a resposta inflamatória ocorrida logo após o primeiro contato das micobactérias com as células residentes e o papel dos neutrófilos, assim como os mediadores inflamatórios liberados em cobaias, ainda são pouco conhecidos. Assim, um estudo mais detalhado no sentido de se compreender o papel das diferentes células e mediadores, nos eventos iniciais da relação que se estabelece entre o parasita e o hospedeiro se faz necessário. Desta forma, no presente trabalho avaliamos o recrutamento celular, a liberação de citocinas, a recuperação de bacilos e a histopatologia do parênquima pulmonar em cobaias infectadas com *Mtb* no intuito de investigar o potencial profilático das vacinas BCG e DNA hsp65, explorando os conceitos de vacina de dose única e "prime-boost".

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial profilático das vacinas BCG e DNA hsp65 em solução (três doses), encapsulada em microesferas (dose única com liberação lenta do DNA) ou método “prime-boost” com microesferas (dose única com liberação rápida da proteína recombinante e lenta do DNA) em cobaias infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*. Para tanto, avaliamos a recuperação de bacilos e a resposta inflamatória induzida pela infecção através do recrutamento celular, da análise do parênquima e das citocinas no pulmão.

Material e Métodos

3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas cobaias fêmeas, recém-desmamadas, linhagem inglesa, pesando entre 170-200 g, provenientes do Biotério do Campus de Ribeirão Preto e mantidas no Biotério I da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram acondicionados em isoladores e mantidos em cabines de segurança biológica classe III (BL-3), no Centro de Pesquisas em Tuberculose, no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, com livre acesso à água e alimento.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Conforme o tratamento recebido, 7-10 animais foram divididos em grupos, como descrito a seguir:

Controles:

Grupo 1 (PBS): cobaias injetadas i.t. com PBS;

Grupo 2 (Mtb): cobaias infectadas i.t. com Mtb;

BCG:

Grupo 3 (BCG + PBS): cobaias injetadas uma única vez por via subcutânea com BCG e injetadas i.t. com PBS;

Grupo 4 (BCG + Mtb): cobaias injetadas uma única vez por via subcutânea com BCG e infectadas i.t. com Mtb;

DNA em solução:

Grupo 5 (sDNA + PBS): cobaias injetadas três vezes por via intramuscular (i.m.) com plasmídeo de DNA controle (pVAX sem o gene hsp65) em solução e injetadas i.t. com PBS;

Grupo 6 (sDNA-hsp65 + PBS): cobaias vacinadas três vezes por via i.m. com o plasmídeo contendo o gene hsp65 (pVAX-hsp65) em solução e injetadas i.t. com PBS;

Grupo 7 (sDNA + Mtb): cobaias injetadas três vezes por via i.m. com plasmídeo de DNA controle (pVAX sem o gene hsp65) em solução e infectadas i.t. com Mtb;

Grupo 8 (sDNA-hsp65 + Mtb): cobaias vacinadas três vezes por via i.m. com o plasmídeo contendo o gene hsp65 (pVAX-hsp65) em solução e infectadas i.t. com Mtb;

DNA encapsulado em microesferas:

Grupo 9 (mDMT + PBS): cobaias injetadas uma única vez por via i.m. com microesferas de co-polímero de ácido poli-lático e poli-glicólico (PLGA) com adjuvante dimicolato de trealose (DMT) e sem inserto de plasmídeo, injetadas i.t. com PBS;

Grupo 10 (mDNA + PBS): cobaias injetadas uma única vez por via i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo de DNA controle (pVAX sem o gene hsp65) e injetadas i.t. com PBS;

Grupo 11 (mDNA + DMT + PBS): cobaias injetadas uma única vez por via i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo de DNA controle (pVAX sem o gene hsp65) e DMT, injetadas i.t. com PBS;

Grupo 12 (mDNA-hsp65 + PBS): cobaias vacinadas uma única vez por via i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo contendo o gene hsp65 (pVAX-hsp65) e injetadas i.t. com PBS;

Grupo 13 (mDNA-hsp65 + DMT + PBS): cobaias vacinadas i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo contendo o gene hsp65 (pVAX-hsp65) e DMT, injetadas i.t. com PBS;

Grupo 14 (mDNA-hsp65 + rHSP65 + PBS): cobaias vacinadas uma única vez por via i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo contendo o gene hsp65 (pVAX-hsp65) juntamente com microesferas de PLGA com a proteína HSP65 recombinante e injetadas i.t. com PBS;

Grupo 15 (mDMT + Mtb): cobaias injetadas uma única vez por via i.m. com microesferas de PLGA com DMT e sem inserto de plasmídeo, infectadas i.t. com Mtb;

Grupo 16 (mDNA + Mtb): cobaias injetadas uma única vez por via i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo de DNA controle (pVAX sem o gene hsp65) e infectadas i.t. com Mtb;

Grupo 17 (mDNA + DMT + Mtb): cobaias injetadas uma única vez por via i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo de DNA controle (pVAX sem o gene hsp65) + DMT e infectadas i.t. com Mtb;

Grupo 18 (mDNA-hsp65 + Mtb): cobaias vacinadas uma única vez por via i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo contendo o gene hsp65 (pVAX-hsp65) e infectadas i.t. com Mtb;

Grupo 19 (mDNA-hsp65 + DMT + Mtb): cobaias vacinadas i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo contendo o gene hsp65 (pVAX-hsp65) e DMT, infectadas i.t. com Mtb;

Grupo 20 (mDNA-hsp65 + rHSP65 + Mtb): cobaias vacinadas i.m. com microesferas de PLGA com plasmídeo contendo o gene hsp65 (pVAX-hsp65) + DMT juntamente com microesferas de PLGA com a proteína HSP65 recombinante e injetadas i.t. com Mtb (“prime-boost”);

3.3. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM DE *Mycobacterium tuberculosis*

A linhagem virulenta Rv (H37Rv – ATCC – 29.294) de *M. tuberculosis* foi mantida em meio de cultura líquida Midlebrook 7H9 enriquecido com ADC (BD Biosciences, SPARKS, USA) à 37°C, durante 10 dias, período em que a cultura atinge a fase logarítmica de crescimento. As colônias foram repicadas em meio sólido Lowenstein-Jensen (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA), permanecendo em cultura por 28 dias e posteriormente mantidas à -70°C. As culturas de *M. tuberculosis* passaram por repiques constantes para manutenção da viabilidade.

3.4. PREPARO DO INÓCULO DE *Mycobacterium tuberculosis*

Uma alíquota de 200 µL da cepa mãe de *M. tuberculosis* H37Rv congelada à -70° C foi retirada e semeada em 10 mL de meio Middlebrook 7H9

enriquecido com ACD e incubada por 7 dias à 37° C até alcançar o crescimento bacteriano com turbidez correspondente a escala padrão de McFarland n° 1 (1×10^6 UFC/mL). No máximo quatro repiques foram feitos a partir da cepa mãe para que não ocorresse alteração da virulência das micobactérias. A suspensão de micobactérias foi centrifugada, a massa obtida foi ressuspensa em 2 mL de PBS estéril e centrifugada a 3500 RPM por 2 a 3 minutos em tubo de vidro estéril contendo pérolas de vidro e PBS. A suspensão foi agitada em vórtex até adquirir aspecto homogêneo. O sedimento foi ressuspensa em 2 mL de PBS estéril, comparado à escala McFarland. A infecção foi realizada somente quando a viabilidade das cepas foi superior a 80%.

3.5. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*

A viabilidade do inóculo foi testada com diacetato de fluoresceína (SIGMA, St. Louis, USA) e brometo de etídeo, de acordo com McDONOUGH & KRESS (1995). A cada 100 µL da suspensão de *M. tuberculosis* a ser utilizada como inóculo foram adicionados 100 µL de diacetato de fluoresceína (2 µL/mL) e 100 µL de brometo de etídeo. As micobactérias foram incubadas a 37°C por 10 minutos e a viabilidade foi determinada em microscopia de fluorescência (Leica).

3.6. OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE DNA

Os plasmídeos (pVAX/Invitrogen®) foram obtidos de acordo com os procedimentos descritos por CRANENBURGH *et al.*, 2001. Para purificação

dos plasmídeos, uma colônia de *Escherichia coli* BL21, transformadas com o plasmídeo PIL 161, contendo ou não o gene da HSP65 de *M. leprae*, (crescida em meio sólido e armazenada à -4° C) foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido com 5 μ L de kanamicina (50 μ g/mL) (SIGMA, St. Louis, USA) e incubada à 37° C durante 4-6 horas sob agitação à 200 rpm (pré-inóculo). Em seguida, foram pipetados 2 mL do pré-inóculo em 2 L de meio LB líquido (Gibco BRL) contendo 2 mL de kanamicina (50 μ g/mL), sendo este material incubado 37° C overnight. Após incubação, as células foram coletadas por centrifugação à 7500 rpm por 15 minutos em centrífuga J2HS (Beckman, rotor JS-7.5). Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e aproximadamente 7,5 g do sedimento obtido foi utilizado para a extração dos plasmídeos, evitando-se saturar a coluna. A purificação dos plasmídeos foi realizada de acordo com especificações do fabricante (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) e, em seguida, estes foram armazenados à -4° C para posterior uso.

3.7. DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS

Os plasmídeos utilizados nas imunizações com DNA em solução (sDNA) foram o vetor pVAX (sDNA) e a construção vacinal pVAX-hsp65 (sDNA-hsp65) (Invitrogen®). Ambos os plasmídeos foram testados para detecção de atividade de endotoxina usando o teste de amebócitos de *Limulus* (LAL test, QCL-1000, Bio Whittaker, CAMBREX). Para esta análise as microesferas foram ressuspensas em PBS e a suspensão foi mantida sob agitação até a completa homogeneização. Na Tabela 1 mostramos que a atividade de endotoxina em todas as formulações de microesferas foi menor que 0,01 EU/ μ g. Segundo a Farmacopéia Européia o nível de segurança para administração endovenosa é de 5 EU/Kg/hora, que corresponde a 0,1 EU por animal (20 g) por hora.

Tabela 1: Níveis de endotoxina nas soluções de sDNA e sDNA-hsp65.

Solução	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	UE/ μg DNA
sDNA – amostra 1	7,1	0
sDNA – amostra 2	7,6	0
sDNA – amostra 3	10,0	0
sDNA – amostra 4	14,7	0
sDNA – amostra 5	13,8	0
sDNA – amostra 6	11,0	0,0013
sDNA-hsp65 – amostra 1	7,1	0
sDNA -hsp65 – amostra 2	7,6	0
sDNA -hsp65 – amostra 3	10,0	0
sDNA -hsp65 – amostra 4	14,7	0
sDNA -hsp65 – amostra 5	13,8	0
sDNA -hsp65 – amostra 6	11,0	0,0013

3.8 - AVALIAÇÃO DA INSERÇÃO DO GENE DA HSP65

A avaliação da presença do inserto no sDNA-hsp65 foi realizada pela digestão do DNA-hsp65 com a enzima de restrição Bam HI. A análise da eletroforese em gel de agarose mostrou uma banda de 3 Kb produzida pela digestão do DNA (Figura 7). As várias bandas que aparecem no sDNA não digerido são devidas ao grau de enovelamento do material (Figura 8).

Figura 1. Perfil eletroforético dos plasmídeos pVAX. A eletroforese foi conduzida em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Canaleta 1 – 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco) utilizado como marcador de peso molecular; Canaleta 2 – pVAX digerido com *BAM* HI; Canaleta 3 – pVAX não digerido; Canaleta 4 – pVAX digerido com *BAM* HI; Canaleta 5 – pVAX não digerido; Canaleta 6 – pVAX digerido com *BAM* HI; Canaleta 7 – pVAX não digerido; Canaleta 8 – pVAX digerido com *BAM* HI; Canaleta 9 – pVAX não digerido; Canaleta 10 – pVAX digerido com *BAM* HI; Canaleta 11 – pVAX não digerido; Canaleta 12 – pVAX digerido com *BAM* HI; Canaleta 13 – pVAX não digerido.

Figura 2. Perfil eletroforético dos plasmídeos pVAX-hsp65. A eletroforese foi conduzida em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Canaleta – 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco) utilizado como marcador de peso molecular; Canaleta 2 – pVAX-hsp65 digerido com *BAM* HI; Canaleta 3 – pVAX-hsp65 não digerido; Canaleta 4 – pVAX-hsp65 digerido com *BAM* HI; Canaleta 5 – pVAX-hsp65 não digerido; Canaleta 6 – pVAX-hsp65 digerido com *BAM* HI; Canaleta 7 – pVAX-hsp65 não digerido; Canaleta 8 – pVAX-hsp65 digerido com *BAM* HI; Canaleta 9 – pVAX-hsp65 não digerido; Canaleta 10 – pVAX-hsp65 digerido com *BAM* HI; Canaleta 11 – pVax-hsp65 digerido com *BAM* HI; Canaleta 12 – pVax-hsp65 não digerido; Canaleta 13 – pVAX-hsp65 digerido com *BAM* HI.

3.9. PREPARO DAS MICROESFERAS

As microesferas foram obtidas pela técnica de evaporação em emulsão/solvente. Suscintamente, 30 mL de solução de diclorometano contendo 400 mg de polímero de ácido poli-lático e poli-glicólico (PLGA) (Resomerfrom Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) e 0,5 mg de dimicolato de trealose (DMT) (SIGMA, St Louis, USA), foi emulsificada com 0,3 mL de uma fase aquosa contendo 5 mg de DNA (mDNA ou mDNA-hsp65) ou 1 mg de proteína recombinante hsp65 usando homogeneizador T25 Ultraturrax (IKA, Labortechnik, Germany) para produzir uma emulsão primária água em óleo. Esta emulsão foi misturada com 100 mL de uma solução aquosa externa contendo 1-3% de poli-(vinil álcool) (Mowiol 40-88, Aldrich Chemicals, Wankee, WI, USA) como surfactante, para formar uma emulsão estável água em óleo em água. A mistura foi agitada por 6 h com homogeneizador IKA RW20 para evaporação do solvente. As microesferas foram coletadas e lavadas três vezes com água estéril, liofilizada e armazenadas à 4° C.

3.10. DETERMINAÇÃO DA TAXA DE ENCAPSULAMENTO DE PLASMÍDEO E PROTEÍNA

Para determinação da taxa de encapsulamento de plasmídeo 10 mg de microesferas foram ressuspensas em 0,2 mL de buffer TE. Uma alíquota de 500 µL de clorofórmio foi adicionada a esta solução. Esta mistura foi mantida sob agitação por 60 min. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi separado para análise. A quantidade de DNA foi

determinada por espectrometria a 260 e 280 nm usando aparelho Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

A taxa de encapsulamento de proteína foi determinada após adição de 0,2 mL de acetonitrilo. As amostras foram incubadas em banho de ultrassom por 15 min, permitindo a completa solubilização das microesferas e em seguida foi adicionada água (1:1). O conteúdo de proteína foi testado usando o reagente Comassie (Pierce, Rockford, Illinois, USA). A concentração de proteína foi determinada a 600 nm usando leitor de ELISA (Σ960, Metertech).

3.11. ANÁLISE DO DIÂMETRO DAS MICROESFERAS

A distribuição do diâmetro das partículas (microesferas) foi avaliada por difractometria a laser em aparelho SHIMADZU SALD 2164 (SHIMADZU, Japão). Resultados foram expressos como valores médios da distribuição dos diâmetros.

3.12. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO, CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E NÍVEIS DE ENDOTOXINA DAS MICROESFERAS

Os plasmídeos utilizados nas imunizações com DNA encapsulado em microesferas de ácido polilático e poliglicólico (PLGA) foram o vetor pVAX (mDNA) e a construção vacinal pVAX-hsp65 (mDNA-hsp65) (Invitrogen®). A eficiência de encapsulamento variou de 30 a 50% para DNA e aproximadamente 70% para proteína. A Tabela 2 mostra a quantidade de DNA e proteína encapsulada nas diferentes formulações. O diâmetro das microesferas foi avaliado por difractometria a laser em aparelho SHIMADZU

SALD (SHIMADZU, Japão). Neste trabalho, as partículas deveriam ter diâmetro menor que 10 μm . Este valor é considerado ideal para que ocorra a fagocitose das partículas pelas células do sistema imunológico dos animais inoculados com as diferentes formulações da vacina DNA-hsp65 em microesferas de PLGA (mDNA-hsp65) e para que o DNA possa exercer sua função sobre estas células. Como demonstrado na Tabela, o diâmetro das microesferas foi de 2,4 a 4,0 em média. Partículas encapsulando DNA foram maiores que as encapsulando proteínas (Tabela 2). A associação com DMT nas microesferas não alterou o diâmetro ou taxa de encapsulamento. A população de microesferas apresentou distribuição gaussiana de diâmetro. As formulações de microesferas foram testadas para detecção de atividade de endotoxina usando teste de amebócitos de *Limulus* (LAL test, QCL-1000, Bio Whittaker, CAMBREX). Na Tabela 2 mostramos que a atividade de endotoxina em todas as formulações de microesferas foi menor que 0,4 EU/mg.

Tabela 2: Valores médios da distribuição de diâmetros, taxa de encapsulamento e níveis de endotoxina em cada formulação de microesferas. Os resultados representam a media de 5 determinações.

Formulação	Composição	Diâmetro (µm)	Taxa de encapsulamento (µg/mg de microesferas)		Nível de endotoxina (UE/mg)
			DNA	Proteína	
mDMT	microesferas sem plasmídeo	4,0	-	-	0,011
mDNA	microesferas de pVAX	4,0	4,11	-	0,011
mDNA + DMT	microesferas de pVAX + DMT	3,7	4,12	-	0,011
mDNAhsp65	microesferas de pVAX-hsp65	3,8	4,85	-	0,028
mDNAhsp65+ TDM	Microesferas de pVAX-hsp65 + DMT	3,5	4,97	-	0,028
mDNA-hsp65 + mrHSP65	Mistura de microesferas contendo: - 50% de pVAX-hsp65 + DMT - 50% de proteína rHSP65 + DMT	3,5	4,90	-	0,030
		2,4	-	1,70	0,053

3.13. IMUNIZAÇÃO COM BCG

Os animais receberam uma única dose subcutânea da vacina BCG liofilizada, cepa Moreau, contendo 10^5 bacilos por via subcutânea. Após a vacinação foi aguardado um período de 30 dias para a infecção dos animais com Mtb (grupos 3 e 4).

3.14. IMUNIZAÇÃO COM DNA EM SOLUÇÃO

Os animais foram injetados três vezes em intervalos de 15 dias no músculo quadríceps com 100 μ g de plasmídeo de DNA (sDNA ou sDNA-hsp65) em 50 μ L de PBS administrado juntamente com 50 μ L de sacarose/PBS 50%. Após a última vacinação foi aguardado um período de 15 dias para a infecção dos animais com Mtb ou inoculação i.t. de PBS (grupos 5 a 8).

3.15. IMUNIZAÇÃO COM DNA ENCAPSULADO EM MICROESFERAS E ESTRATÉGIA DE “PRIME-BOOSTER”

Os animais receberam uma única dose intramuscular de 100 μ L de PBS com 10 mg de microesferas (30 μ g de mDNA ou mDNA-hsp65) administrados em quatro sítios diferentes do músculo quadríceps. Após a vacinação foi aguardado um período de 15 dias para a infecção dos animais com Mtb ou inoculação i.t. de PBS (grupos 9-13 e 15-19).

A estratégia de “prime-booster” consistiu na vacinação dos animais com uma única dose da vacina de DNA encapsulada em microesferas administrada juntamente com a proteína HSP65 recombinante (grupos 14 e 20). Para tanto, 30 μ g de DNA hsp65 adsorvidos em microesferas foram misturados à mesma

quantidade de proteína HSP65 recombinante também adsorvida em microesferas. Os animais receberam uma única dose intramuscular de 100 µL de PBS contendo ambas as microesferas (30 µg de DNA-hsp65 e 30 µg de rHSP65) administrados em quatro sítios diferentes do músculo quadríceps.

3.16. INFECÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com 2,2,2 – Tribromoetanol 99% (ACROS, New Jersey, USA), 2,5% em PBS estéril (250 mg/Kg). Os animais foram inoculados pela via intratraqueal (i.t.) com 0,5 mL de suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv contendo 1×10^5 bacilos/animal. Animais controles receberam 0,5 mL de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Todos os procedimentos experimentais com o bacilo da tuberculose foram realizados em BL-3. Todo o material utilizado no decorrer dos experimentos foi descontaminado por autoclavação anteriormente ao descarte.

3.17. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) E CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

A coleta das células do LBA foi realizada através da inserção de um catéter acoplado a uma seringa contendo 2,5 mL de PBS estéril com 0,5% de citrato de sódio, injetados para a lavagem do espaço broncoalveolar. Esse procedimento foi repetido duas vezes com o mesmo volume de PBS para obtenção do LBA, acondicionado em tubos plásticos individuais conservados no gelo no decorrer dos experimentos. A contagem do número total de

leucócitos presentes nos lavados foi feita em câmara de Neubauer, sendo que para tanto 20 µL de cada amostra foram diluídos em 380 µl de solução de Turk. A contagem diferencial das células foi feita em esfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon Souther Products Ltd., Cheshire, UK), submetidos à coloração pelo corante Rosenfeld (Faccioli *et al.*, 1990).

3.18. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO

A histopatologia dos pulmões foi feita em colaboração com o Dr. Édson Garcia Soares do Departamento de Patologia da FMRP-USP. Para tanto, o lóbulo inferior esquerdo do pulmão de animais de diferentes grupos experimentais foi removido e cortado em pequenos fragmentos. Os tecidos foram fixados em tampão de Millonig (10% de formaldeído (SIGMA, St. Louis, USA), 1,86% de fosfato de potássio monobásico e 0,42% de hidróxido de sódio (MERCK, Montreal, Canadá), pH 7,4), desidratados em álcool 70%, clarificados em xilol e inclusos em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. O excesso de parafina foi removido pela lavagem das lâminas com xilol. Em seguida, os tecidos foram reidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao 80%) e corados com hematoxilina-eosina (HE), desidratados em concentrações crescentes de álcool (80% ao absoluto), lavados com xilol e cobertos com lamínulas para análise dos componentes celulares e organização tecidual.

3.19. DETERMINAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)

Pulmões de animais infectados com *M. tuberculosis*, o lóbulo superior direito do pulmão foi retirado 30 e 60 dias após a infecção, submetidos à pesagem em placas de Petri (Falcon, BD, Franklin Lakes, NJ) contendo 2 mL de RPMI-I Sigma (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA). O fragmento de pulmão foi cortado em pequenos fragmentos, recolhidos com auxílio de pipeta e transferidos para um tubo cônico de 50 mL contendo 15 mL de RPMI-I acrescido de liberase (0,5 µg/mL) (SIGMA, St. Louis, USA) e incubados à 37°C, durante 30 minutos, sob agitação constante à 150 rpm (agitador orbital, Incubator shaker series 25, New Brunswick, Edison, NJ, USA). Após incubação, as células foram dispersas com uma seringa de 10 mL. A suspensão celular obtida foi diluída em RPMI-I (1:10; 1:100; 1:1000), alíquotas de 150 µL das diluições foram distribuídas em placas de Petri (Falcon, BD, Franklin Lakes, NJ) contendo meio 7H11 (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich). Após 28-30 dias de cultivo à 37° C, o número de UFC foi contado e o valor corrigido por grama de tecido.

3.20. DETECÇÃO DE CITOCINAS PELO MÉTODO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) NO HOMOGENEIZADO DO PULMÃO

Para a dosagem de citocinas, o lóbulo inferior direito do pulmão foi armazenado à -70° C até o momento da dosagem. Após o descongelamento dos pulmões, foram adicionados 3 mL de RPMI-I aos tubos contendo os pulmões e estes foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos

(Ultraturax T 50 IKA – Labortechnik, Germany). O lisado celular foi centrifugado à -4°C por 15 minutos, a 10.000 g (Centrífuga Avanti 30, Beckman) e o sobrenadante submetido à dosagem das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 (R & D Systems, MN, USA) pelo método ELISA empregando anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e citocinas padrões, de acordo com instruções do fabricante. Os anticorpos de captura foram diluídos em tampão carbonato (100 μL /poço), na concentração indicada pelo fabricante, e após incubação das placas durante uma noite à 4°C , as mesmas foram lavadas 3 vezes com PBS com 0,05% de Tween (SIGMA, St. Louis, USA) (tampão de lavagem). Após as sucessivas lavagens e secagem da placa, foram adicionadas 300 μL /poço de PBS contendo 1% de BSA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) (tampão de bloqueio) seguido de incubação à temperatura ambiente no mínimo por 1 hora. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados três vezes com o tampão de lavagem, e então adicionados 100 μL das amostras para a quantificação das citocinas. Depois de repetido o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 μL /poço dos anticorpos de detecção biotinilados, na concentração indicada pelo fabricante. Anticorpos biotinilados para citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ (R & D Systems, MN, USA) foram diluídos em tampão de bloqueio com 0,05 % de Tween durante 2 horas. Após a incubação foi repetido novo ciclo de lavagem, e em seguida feita a amplificação da reação pela adição de 100 μL /poço de estreptoavidina/biotina (Dako, Carpinteria, CA, USA), diluído em tampão de bloqueio com 0,05% de Tween, na concentração de 1,25 mg/mL com incubação por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 μL /poço da solução de substrato, contendo H_2O_2 e

tetrametilbenzidina (TMB) (Genzyme Diagnostics) e as placas foram incubadas por 20-30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada adicionando 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M). A densidade ótica (D.O.) foi avaliada em leitor de microplacas com filtro de 450 ou 490 nm (Metertech Inc., modelo 960) e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão.

3.21. REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

As PCRs para detectar a expressão do gene para IFN-γ foram realizadas em colaboração com a Dr. Beatriz Rosseti Ferreira do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP. Para tanto, o cDNA foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização da enzima M-MVL Reverse Transcriptase, (Promega Corporation, Madison, USA) utilizando 1 µg de RNA. As reações em cadeia com polimerase (PCRs) foram realizadas com a enzima *Taq* polimerase (*Taq* DNA Polymerase, Promega), dNTP e primers específicos para cada citocina. As PCRs foram feitas no termociclador PTYC-100 (MJ Research, Watertown, MA). As condições básicas da reação foram: 1 minuto à 95°C para desnaturação, seguido por 27 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto à 58°C para o anelamento dos primers às fitas do cDNA e 2 minutos à 72°C de extensão acrescidos de um passo de extensão final de 7 minutos à 72°C. Além das reações para detecção de mensagem para citocinas, as amostras também foram submetidas a PCR para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) (Klunner *et al.*, 2001), um gene de expressão

constitutiva que foi utilizado como controle positivo das reações de amplificação.

Os produtos de PCR obtidos para o gene constitutivo e de IFN- γ foram separados por grupos de animais e submetidos à eletroforese em géis individuais. Em cada gel de poliacrilamida 6%, foram aplicados 5 μ l dos produtos de PCR. Os géis foram corados com nitrato de prata 0,2%, secos (temperatura ambiente) e digitalizados, em tons de cinza, utilizando scanner com resolução de 300 dpi.

3.22. ANÁLISE DA INTENSIDADE DE EXPRESSÃO DE mRNA

A obtenção dos valores numéricos referentes à intensidade das bandas para as citocinas presentes nos géis foi realizada utilizando o programa ImageTool (The University of Texas Health Science Center-San Antonio, USA). Seguindo as orientações do programa, as imagens dos géis já digitalizadas foram padronizadas em relação ao seu tamanho e tonalidade. Um dos géis contendo os produtos para o gene constitutivo foi utilizado como gel padrão para os ajustes de tamanho e tonalidade nos demais géis. Com base no mesmo gel padrão e controles negativos, foi determinada uma barra de calibragem, que serviu então de base de referência para o limiar de detecção das bandas no programa ImageTool, sendo então utilizados os valores de zero e 114 unidades arbitrárias como limite para detecção máxima e mínima das bandas das citocinas. Depois de localizadas as bandas, seguiram-se com as análises dos géis, nos quais o valor utilizado foi a razão entre a área e a intensidade (ou absorbância) em unidades arbitrárias de intensidade (UAI).

Antes de serem submetidos à análise estatística, os valores numéricos obtidos em UAI para IFN- γ foram normalizados ao serem divididos pelos valores obtidos para os respectivos controles (G3PDH). Dessa forma, obteve-se dados referentes à maior ou menor expressão da intensidade de mRNA para IFN- γ em relação à intensidade do mRNA para o G3PDH.

3.23. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO PULMÃO

Para realização das análises morfométricas fragmentos do pulmão foram processados, como descrito no item 3.18. As imagens dos tecidos foram capturadas para o computador com a câmera Olympus Q Color 3, acoplada ao microscópio BX 40 (OLYMPUS OPTICAL CO, LTDA, JAPAN) e as análises realizadas com o auxílio do programa de análise de imagens Image Tool (EVANS TECHNOLOGY, INC.).

3.24. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa INSTAT. As diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais foram calculadas pelo teste t de Student. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Resultados

4.1. COBAIAS INFECTADAS COM *Mycobacterium tuberculosis*

4.1.1 - Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar

Os eventos iniciais ocorridos durante a infecção pulmonar com micobactérias não são totalmente compreendidos e existem poucos modelos para avaliar o primeiro contato do hospedeiro com as micobactérias. Neste trabalho, avaliamos qualitativamente e quantitativamente o recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar de cobaias recém-desmamadas (jovens) nas fases inicial e tardia da infecção.

A Figura 3 mostra o recrutamento celular em animais recém-desmamados e infectados com Mtb. Ocorreu aumento significativo do número de leucócitos totais recrutados para o espaço broncoalveolar (EBA) nos dias 1, 2, 4, 15 e 30 dias após a infecção com Mtb, quando comparado com o grupo de animais inoculados com PBS (Figura 3A). O pico do recrutamento de leucócitos totais ocorreu no 15º dia após a infecção. No 90º dia subsequente à infecção, não foi observada diferença significativa no recrutamento celular entre os animais controles ou infectados com Mtb (Figura 3). Também foi observado aumento significativo do número de neutrófilos entre o 1º e o 30º dia após a infecção com Mtb, sendo o pico do recrutamento destas células atingido no 15º dia (Figura 3B). Ao contrário, o recrutamento de células mononucleares aumentou significativamente somente no 15º dia após a infecção (Figura 3C).

Figura 3 – Cinética do recrutamento de leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares para o espaço broncoalveolar de cobaias recém-desmamadas infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*. Os animais foram infectados i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animais controles receberam PBS estéril pela mesma via de inoculação. Os resultados foram expressos como Média $\pm$ EPM de 2 experimentos diferentes ($n = 7$). * $p < 0,05$ representa diferença significativa entre os animais injetados com PBS e os infectados.

4.1.2. Avaliação do peso corpóreo

Durante o período em que avaliamos o recrutamento celular, demonstrado no ítem anterior, observamos perda de peso após a 3^a semana de infecção, em relação ao grupo controle inoculado com PBS. A Figura 4 mostra o peso individual de animais no 30^o dia após a inoculação de PBS ou infecção com Mtb.

Figura 4 – Massa corpórea de cobaias infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*. Peso individual (círculos) e médio (barras) de cobaias 30 dias após infecção com *M. tuberculosis* (Mtb). Animais controles foram inoculados com PBS estéril pela mesma via. Resultados expressos em gramas por animal (n = 4-6) de 2 experimentos diferentes. * $p < 0,05$ representa diferença significativa entre os animais injetados com PBS e os infectados.

4.1.3. Histopatologia do parênquima pulmonar

A análise do infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar foi realizada em cortes histológicos do pulmão de animais após diferentes períodos de infecção. Nos animais inoculados com PBS, não foram observadas alterações na arquitetura do parênquima pulmonar em todos os períodos analisados. Na Figura 5 observamos corte de pulmão de animal controle coletado no início do período experimental. O parênquima pulmonar apresentou alvéolos normais, não dilatados, brônquios íntegros e poucas células no local (Figura 5A). A Figura 3B mostra o parênquima após 1 dia de infecção. Neste período ainda não foram encontradas alterações significativas, mas já observa-se infiltrado leucocitário disperso. No 2º e 4º dias após a infecção, a bactéria induziu intenso recrutamento de células inflamatórias, com predomínio de células mononucleares localizadas ao redor dos brônquios, as quais começam a se organizar (formação de granulomas) (Figura 5C e 5D). Já no 15º dia após a infecção foi observado intenso recrutamento celular, constituído de macrófagos e linfócitos ao redor de vasos e desorganização parcial da arquitetura do parênquima pulmonar em virtude da formação mais definida de arranjos celulares com aspecto de granuloma, entre vasos e bronquíolos (Figura 5E). No 30º dia após a infecção, nos granulomas presentes no parênquima pulmonar dos animais infectados, foram observamos somente infiltrados de macrófagos e linfócitos, porém ainda estavam ausentes células de aspecto epitelióide (Figura 5F).

Figura 5 – Histopatologia do parênquima pulmonar de cobaias infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*. As fotomicrografias mostram cortes histológicos representativos do parênquima pulmonar dos animais inoculados com PBS estéril i.t. (A) ou infectados i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Parênquima pulmonar no 1º (B); 2º (C); 4º (D); 15º (E) e 30º dia (F) após a infecção. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina. Aumento de 25x.

4.2. COBAIAS VACINADAS COM BCG E INFECTADAS COM *Mycobacterium tuberculosis*

4.2.1. Recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar

A vacinação com BCG inibiu de modo significativo o recrutamento de leucócitos totais para o espaço broncoalveolar no 4º dia subsequente à infecção e, embora no 2º dia, não tenha ocorrido redução estatisticamente significativa, foi verificada tendência à redução do número destas células nos animais vacinados, como demonstrado na Figura 6A.

De modo semelhante ao ocorrido em relação aos leucócitos totais, a vacinação com BCG reduziu o recrutamento de neutrófilos para EBA no 2º e 4º dias após a infecção com Mtb (Figura 6B). Embora na fase inicial da infecção a vacinação dos animais com BCG tenha resultado na inibição do recrutamento de neutrófilos para o espaço broncoalveolar, na fase tardia (15, 30 e 90 dias) da mesma não foram observadas diferenças em relação aos animais controle (PBS), como demonstrado na Figura 6B.

O recrutamento de células mononucleares para o espaço broncoalveolar de animais infectados não foi alterado de modo significativo pela vacinação prévia dos animais com BCG em nenhum dos tempos analisados (Figura 6C).

Figura 6 – Leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C) presentes no espaço broncoalveolar. Cobaias receberam uma única dose subcutânea de 10⁵ BCG. Após 30 dias, os animais foram infectados com 10⁵ bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animais controles foram inoculados com PBS estéril i.t. As células foram recuperadas após 1, 2, 4, 15, 30 e 90 dias de infecção. Os resultados são expressos como Média ± EPM de 2 experimentos diferentes ($n = 7$). * $p < 0,05$ representa diferença significativa entre os animais injetados com PBS e os demais grupos, # representa diferença significativa entre os animais infectados com Mtb, vacinados ou não.

4.2.2. Recuperação de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium tuberculosis*

Com o intuito de avaliar o efeito protetor da vacina BCG em animais infectados, no 30º e 90º dias após a infecção com Mtb foi feita a recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) nos pulmões de animais previamente vacinados ou não com BCG (Figura 7). Estes períodos de análise foram escolhidos devido à observação macroscópica da formação de granulomas. O número de UFC recuperadas de animais infectados foi constante no decorrer da infecção, sendo recuperados 4,7 log₁₀ UFC em ambos os tempos avaliados. A vacinação com BCG não interferiu no número de UFC recuperadas de animais infectados, sendo 4,5 log₁₀ e 4,7 log₁₀ UFC recuperadas após 30 e 90 dias, respectivamente.

Figura 7. Efeito da vacina BCG sobre o número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium tuberculosis* nos pulmões. A recuperação das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada no 30^o e 90^o dias após infecção com 10⁵ bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Os animais receberam uma única dose subcutânea de 10⁵ BCG. Após a vacinação foi aguardado um período de 30 dias para a infecção dos animais com Mtb. Os resultados são expressos como Média ± EPM de 2 experimentos diferentes ($n = 7$).

4.2.3. Histopatologia do parênquima pulmonar

A Figura 8 mostra fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de cobaias vacinadas com BCG no 30º dia de infecção. Note em A e E, a integridade dos alvéolos pulmonares e ausência de infiltrado inflamatório no parênquima de animal não infectado (controle), inoculado i.t. com PBS no 30º e 90º dia anteriores à coleta do pulmão. Assim como nos animais controle, a vacinação com BCG e posterior inoculação de PBS manteve a integridade do parênquima pulmonar em ambos os períodos avaliados (Figuras 8B e 8F). Quando comparado com animais não infectados, verificamos que no parênquima pulmonar de animais não vacinados e infectados com Mtb ocorreu intenso acúmulo de células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos (Figuras 8C e 8G). No período de 30 dias, as células recrutadas para o pulmão de animais infectados, formam agregado maciço de células, caracterizando a formação de granulomas compactos (Figura 8C). Nos animais vacinados com BCG e infectados com Mtb, não foram visualizadas diferenças em relação aos animais somente infectados. Nos pulmões de animais vacinados e infectados, também há presença de macrófagos adjacentes aos espaços alveolares, circundados por denso acúmulo de linfócitos e presença de granulomas (Figuras 8D e 8H).

Figura 8 – Histopatologia do parênquima pulmonar. As fotomicrografias mostram cortes histológicos representativos do parênquima pulmonar dos animais vacinados ou não pela via subcutânea com 10^5 BCG e após infecção i.t. com *M. tuberculosis* (Mtb). Animais não infectados (controle) foram inoculados com PBS estéril pela mesma via. Animal controle no 30º (A) e no 90º dia (E); vacinado e inoculado com PBS no 30º (B) e 90º dia (F); infectado no 30º (C) e 90º dia (G); vacinado e infectado no 30º (D) e 90º dia (H). As setas indicam o acúmulo de macrófagos e linfócitos ocorrido em C, D, G e H arranjados em granulomas compactos. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina. Aumento de 25x.

4.3. COBAIAS VACINADAS COM sDNA-hsp65 E INFECTADAS COM *Mycobacterium tuberculosis*

4.3.1. Recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar

A Figura 9A mostra o efeito da vacinação com sDNA-hsp65 no recrutamento de neutrófilos para o espaço broncoalveolar nos dias 1, 2, 4, 30 e 60 dias após a infecção pelo Mtb. No 1º, 2º e 4º dias subsequentes à infecção foi observada inibição significativa do recrutamento de neutrófilos em animais vacinados com sDNA-hsp65 quando comparado com animais não vacinados e infectados com Mtb. Embora a análise dos resultados não tenha diferença significativa estatisticamente dos valores, a vacinação dos animais com sDNA-hsp65 inibiu o recrutamento de neutrófilos no 60º após a infecção. Resultados similares foram obtidos em animais injetados com DNA controle (sDNA) sem o gene hsp65, quando comparado com animais não vacinados e infectados com Mtb. A vacinação com sDNA-hsp65 também diminuiu o número basal de células presentes no EBA, particularmente no 2º dia após a infecção, quando comparado com animais somente injetados com PBS. Apesar do efeito antiinflamatório da vacinação com sDNA-hsp65 na fase inicial da infecção, no 30º dia após a infecção, foi verificado aumento significativo do recrutamento de neutrófilos nos animais infectados e vacinados com sDNA-hsp65 (Figura 9A).

Ao contrário do observado em animais vacinados com BCG, em animais vacinados com sDNA-hsp65, o recrutamento de células mononucleares para o

EBA foi também diminuído de modo significativo no 1º, 2º, 4º e no 60º dia após a infecção (Figura 9B). Nos animais inoculados com sDNA, houve também redução significativa do recrutamento de células mononucleares no 1º, 2º e 4º dias após a infecção, com valores similares aqueles obtidos de animais injetados apenas com PBS. Além disso, no 4º dia após a infecção foi observada diminuição significativa do número de células presentes no EBA de animais injetados com PBS, em relação aos animais vacinados com sDNA-hsp65 e injetados com PBS. No entanto, o recrutamento de células mononucleares induzido pelo Mtb não foi alterado pela vacinação dos animais com sDNA-hsp65 no 30º dia após a infecção.

Figura 9. Neutrófilos (A) e células mononucleares (B) presentes no espaço broncoalveolar. Cobaia foram injetadas 3 vezes em intervalos de 15 dias no músculo quadríceps com 100 µg de sDNA-hsp65 em 50 µL de PBS administrado juntamente com 50 µL de sacarose/PBS 50%. Após a vacinação foi aguardado um período de 15 dias para a infecção dos animais com 10⁵ bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animais controles receberam 100 µL de PBS ou sDNA (sem o gene da HSP65) i.m. e foram inoculados com PBS estéril i.t. As células foram recuperadas após 1, 2, 4, 15, 30 e 60 dias de infecção. Os resultados são expressos como Média ± EPM de 2 experimentos diferentes ($n = 7-10$). * $p < 0,05$ representa diferença significativa entre os animais injetados com PBS e os demais grupos, # representa diferença significativa entre os animais infectados com Mtb, vacinados ou não.

4.3.2. Recuperação de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium tuberculosis*

Com o intuito de avaliar o efeito protetor da vacina sDNA-hsp65 na infecção, foi feita a recuperação de UFC de pulmões de animais previamente vacinados ou não com sDNA-hsp65 no 30º dia após a inoculação de Mtb (Figura 10). Ao contrário do observado em animais vacinados com BCG, a vacina sDNA-hsp65 reduziu o número de bacilos recuperados dos pulmões de animais infectados em 1,29 $\log_{10}$. A recuperação de UFC dos pulmões de animais infectados, previamente injetados com o DNA controle (sDNA) sem o gene da HSP65 não foi diferente da observada nos animais infectados, que não receberam nenhum tipo de tratamento.

Com objetivo de avaliar a manutenção da resposta protetora por um maior período de tempo foi feita a recuperação de UFC de pulmões também no 60º dia após a infecção. A Figura 10 mostra que a resposta protetora induzida pela vacina sDNA-hsp65 foi mantida, porém em menor intensidade após 60 dias de infecção, com a redução de 0,6 $\log_{10}$ do número de bacilos recuperados do pulmão. Nos animais infectados e previamente injetados com sDNA, sem o gene da HSP65, a recuperação de unidades formadoras de colônia nos pulmões foi similar àquela observada em animais infectados.

Figura 10. Efeito da vacina sDNA-hsp65 sobre o número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium tuberculosis* nos pulmões. A recuperação das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada no 30º e 60º dia após infecção i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Os animais foram injetados 3 vezes em intervalos de 15 dias no músculo quadríceps com 100 µg de plasmídeo de DNA em 50 µL de PBS administrado juntamente com 50 µL de sacarose/PBS 50%. Após a vacinação foi aguardado um período de 15 dias para a infecção dos animais com Mtb. Animais controles receberam 100 µL de PBS ou sDNA (pVAX) i.m. e foram inoculados posteriormente com PBS estéril i.t. Os resultados são expressos como Média $\pm$ EPM ($n = 7-10$) de dois experimentos diferentes. * $p < 0,5$ Log₁₀ representa diferença significativa quando comparado ao grupo infectado; # $p < 0,5$ Log₁₀ representa diferença significativa quando comparado ao grupo inoculado com sDNA e infectado.

4.3.3. Produção de citocinas por células de pulmões

Apesar da inexistência de reagentes específicos para cobaias, Faccioli *et al.*, 1997 demonstraram que anticorpos humanos podem ser utilizados para dosagem de citocinas de cobaias, devido à grande homologia entre as citocinas de ambas as espécies. Deste modo, usando anticorpos anti-citocinas humanas, a produção de IL-2, IL-4 e IL-10 foi quantificada por ELISA no sobrenadante do lisado celular do parênquima pulmonar nos diferentes grupos experimentais no 30º dia após a infecção. Este período foi escolhido pois foi quando ocorreu aumento do número de neutrófilos e redução de UFC nos pulmões de animais vacinados com sDNA-hsp65 e infectados com Mtb.

A síntese de IL-2 por células de pulmões de animais controle, inoculados com PBS, não foi alterada pela inoculação prévia de sDNA. No entanto, a vacinação de animais controle com sDNA-hsp65 induziu aumento na produção de IL-2, em relação aos animais inoculados com sDNA e PBS. A infecção com Mtb não modificou a síntese de IL-2 em relação aos valores obtidos de células de pulmões de animal controle. Nos animais infectados e vacinados com sDNA-hsp65, houve um aumento na produção de IL-2, quando comparado aos valores obtidos de células de pulmões de animais inoculados com sDNA (Figura 11A).

A produção de IL-4 pelas células de pulmões não foi alterada pela infecção com Mtb e nem pela inoculação de sDNA ou vacinação com sDNA-hsp65 no 30º dia após a infecção, como demonstrado na Figura 11B.

A síntese de IL-10 pelas células de pulmões de animais controle

inoculados com sDNA ou vacinados com sDNA-hsp65 não foi alterada. Ao contrário, em animais infectados, a vacinação com sDNA-hsp65 resultou em aumento na síntese de IL-10 em relação aos valores obtidos de animais inoculados com sDNA (Figura 11C).

Outra citocina para qual foi realizada dosagem no sobrenadante do lisado do parênquima pulmonar por ELISA foi IFN- γ . Entretanto, os anticorpos humanos não reconheceram esta citocina de cobaias, impossibilitando a dosagem desta. Para solucionar este problema, fragmentos de pulmão foram armazenados em trizol à -80° C e utilizados para extração de RNA e subsequente PCR com primers específicos para citocinas de cobaias. Empregando o método de PCR para análise da expressão do gene para IFN- γ através da razão IFN- γ / β -actina em amostras de pulmão de cobaias vacinadas ou não com sDNA-hsp65, como também de seus respectivos controles, no 30° dia após infecção com Mtb. Nos animais infectados, a expressão do gene para IFN- γ não foi alterada pela inoculação de sDNA (pVAX) ou vacinação com sDNA-hsp65. A infecção com Mtb resultou em diminuição na expressão do gene IFN- γ . De modo similar, a inoculação de sDNA não alterou de modo significativo a expressão de IFN- γ induzida pela infecção. Já a vacina sDNA-hsp65 reverteu de modo significativo a diminuição da expressão do gene para IFN- γ induzida pela infecção e aumentou a expressão desse gene acima dos valores observados em animais infectados. A expressão do gene para β -actina foi utilizada como controle da expressão devido à sua expressão constitutiva (Figura 12).

Além do ELISA e da PCR foi realizada citometria de fluxo para os

marcadores CD₄ e CD₈ humanos e murinos. Como bloqueio de ligações inespecíficas foi utilizado soro de cobaias. Similarmente, não foram obtidos resultados em virtude dos anticorpos humanos utilizados não reconhecerem os marcadores presentes na superfície das células de cobaias.

Figura 11. Níveis de citocinas no sobrenadante do lisado celular do parênquima pulmonar de cobaias. Os animais foram injetados 3 vezes em intervalos de 15 dias no músculo quadríceps com 100 µg de plasmídeo de DNA em 50 µL de PBS administrado juntamente com 50 µL de sacarose/PBS 50%. Após um período de 15 dias da última imunização, os animais foram infectados i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animais controles receberam 100 µL de PBS ou sDNA (pVAX) i.m. e foram inoculados posteriormente com PBS estéril i.t. A concentração de IL-2, IL-4 e IL10 foi quantificada 30 dias após a infecção. Os resultados são expressos como Média $\pm$ EPM ($n = 7-10$) de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ representa diferença significativa entre os animais injetados com PBS e os demais grupos; # representa diferença significativa entre os animais injetados com Mtb e os grupos vacinados.

Figura 12 - Análise densitométrica da expressão do gene para IFN- γ no pulmão de cobaias vacinadas com sDNA-hsp65 e infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*. Os animais foram injetados 3 vezes em intervalos de 15 dias no músculo quadríceps com 100 μ g de plasmídeo de DNA em 50 μ L de PBS administrado juntamente com 50 μ L de sacarose/PBS 50%. Após um período de 15 dias da última imunização, os animais foram infectados i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animais controles receberam 100 μ L de PBS ou sDNA (pVAX) i.m. e foram inoculados posteriormente com PBS estéril i.t. A análise da expressão do gene para IFN- γ foi realizada em amostras de pulmão coletadas no 30º dia após infecção. A expressão do gene para β -actina foi utilizada como controle devido à sua expressão constitutiva e a expressão do gene para IFN- γ foi obtida através da razão IFN- γ / β -actina. Os resultados são expressos como Média $\pm$ EPM ($n = 4-10$) de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ representa diferença significativa entre os animais injetados com PBS e os demais grupos; # representa diferença significativa entre os animais injetados com Mtb e os grupos vacinados.

4.3.4. Histopatologia do parênquima pulmonar

As Figuras 13 e 14 mostram fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de cobaias inoculadas com DNA não encapsulado (sDNA ou sDNA-hsp65) e seus respectivos controles, no 30º e 60º dias após a infecção pelo Mtb. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (HE). Animais controles foram inoculados com PBS.

No 30º dia após inoculação de PBS, pode-se notar a integridade os alvéolos pulmonares e ausência de infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar (Figura 13A). A administração de sDNA ou sDNA-hsp65 não induziu infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar de animais inoculados com PBS (Figuras 13B e 13C). No 30º dia após infecção com Mtb, os pulmões apresentaram intenso acúmulo de células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos. Neste período de análise, as células recrutadas para o pulmão de animais infectados ocuparam todo o espaço alveolar e formaram agregado maciço de células, caracterizando a formação de granulomas compactos (Figura 13D). Nos animais inoculados com sDNA ou vacinados com sDNA-hsp65 e infectados o dano tecidual foi similar ao grupo infectado, com macrófagos adjacentes aos espaços alveolares, circundados por denso acúmulo de linfócitos (Figuras 13E e 13F).

Os resultados no 60º dia após a infecção com Mtb foram similares aos observados no 30º dia. Nos animais injetados com PBS, inoculados ou não com sDNA ou sDNA-hsp65, os pulmões não apresentaram infiltrado inflamatório e os alvéolos pulmonares apresentaram-se íntegros (Figuras 14A, 14B e 14C). Nos animais infectados observamos a formação de granulomas

compactos e bem definidos no parênquima pulmonar (Figura 14D). Nos animais inoculados com sDNA ou vacinados com sDNA-hsp65 não foi observada redução do dano tecidual induzido pela infecção com Mtb (Figuras 14E e 14F).

Figura 13 – Histopatologia do parênquima pulmonar. As fotomicrografias mostram cortes histológicos representativos do parênquima pulmonar de animais vacinados ou não com sDNA-hsp65 no 30º dia após infecção i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animal inoculado com PBS i.t. (A); sDNA i.m. e PBS i.t. (B); sDNA-hsp65 i.m. e PBS i.t. (C); Mtb i.t. (D); sDNA i.m. e Mtb i.t. (E); sDNA-hsp65 i.m. e Mtb i.t. (F). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina. Aumento de 25x.

Figura 14 – Histopatologia do parênquima pulmonar. As fotomicrografias mostram cortes histológicos representativos do parênquima pulmonar de animais vacinados ou não com sDNA-hsp65 no 60º dia após infecção i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animal inoculado com PBS i.t. (A); sDNA i.m. e PBS i.t. (B); sDNA-hsp65 i.m. e PBS i.t. (C); Mtb i.t. (D); sDNA i.m. e Mtb i.t. (E); sDNA-hsp65 i.m. e Mtb i.t. (F). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina. Aumento de 25x.

4.4. COBAIAS VACINADAS COM mDNA-hsp65 E INFECTADAS COM *Mycobacterium tuberculosis*

4.4.1. Recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar

A Figura 15A mostra o efeito da vacinação com uma única dose de diferentes formulações de microesferas de PLGA sobre o recrutamento de neutrófilos para o espaço broncoalveolar de cobaias no 30º dia após a infecção pelo Mtb. Em animais infectados, a vacina de dose única encapsulada na formulação contendo o gene da hsp65 e o adjuvante dimicolato de trealose (DMT) (mDNA-hsp65 + DMT) aumentou o número de neutrófilos recrutados para o espaço broncoalveolar. No entanto, a inoculação de microesferas sem o gene da HSP65, porém contendo o adjuvante DMT (mDNA + DMT + Mtb) também aumentou o recrutamento de neutrófilos induzido pela infecção. De modo similar, nos animais infectados, o número de neutrófilos foi também aumentado significativamente após vacinação pelo método de “prime” com o mDNA-hsp65 e “booster” com a proteína recombinante HSP65 (mDNA-hsp65 + mrHSP65).

O recrutamento de células mononucleares para o EBA não foi alterado de modo significativo no 30º dia após a infecção por nenhuma das formulações da vacina de DNA encapsulado em microesferas de PLGA (Figura 15B).

Figura 15. Neutrófilos (A) e células mononucleares (B) presentes no espaço broncoalveolar. Os animais receberam uma única dose intramuscular de 10 mg de microesferas (30 µg de DNA) em 100 µL de PBS no músculo quadríceps, administrados em quatro sítios diferentes. Após a vacinação foi aguardado um período de 15 dias para a infecção i.t. dos animais com 10⁵ bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animais controles receberam 100 µL de PBS ou mDNA (pVAX) i.m. e foram inoculados com PBS estéril i.t. Os resultados são expressos como Média ± EPM de 2 experimentos diferentes ($n = 7-10$). * $p < 0,05$ representa diferença significativa entre os animais injetados com PBS e os demais grupos, # representa diferença significativa entre os animais infectados com Mtb, vacinados ou não.

4.4.2. Recuperação de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium tuberculosis*

Como demonstrado na Figura 16, a vacinação com uma única dose de DNA-hsp65 empregando microesferas de PLGA foi eficiente em reduzir o número de bacilos recuperados dos pulmões dos animais infectados em duas formulações diferentes, no 30º dia após a infecção com Mtb. A formulação que continha o gene da HSP65 e o adjuvante DMT reduziu o número de bacilos recuperados em 0,6 Log₁₀ (mDNA-hsp65 + DMT + Mtb). De modo similar, a vacinação com a estratégia de “prime-boost”, utilizando microesferas contendo o DNA hsp65 e a proteína HSP65 recombinante (mpVAXhsp65 + rhsp65) também diminuiu a recuperação de bacilos em 0,5 Log₁₀.

Esses resultados mostram que a administração de uma única dose da vacina de DNA encapsulada em microesferas contendo DNA-hsp65 e o adjuvante DMT (mDNA-hsp65+DMT) e também a estratégia de “prime-boost” (mDNA-hsp65 + mrHSP65) foram capazes de proteger cobaias da infecção com Mtb.

Figura 16. Efeito da vacina mDNA-hsp65 sobre o número de unidades formadoras de colônia de *Mycobacterium tuberculosis* nos pulmões. A recuperação das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada no 30º dia após infecção i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Os animais receberam uma única dose intramuscular de 10 mg de microesferas (30 µg de DNA) em 100 µL de PBS no músculo quadríceps, administrados em quatro sítios diferentes. Após a vacinação foi aguardado um período de 15 dias para a infecção dos animais com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv. Animais controles receberam 100 µL de PBS ou mDNA (pVAX) i.m. e foram inoculados com PBS estéril i.t. Os resultados são expressos como Média ± EPM de 2 experimentos diferentes ($n = 7-10$). * $p < 0,5$ Log₁₀ representa diferença significativa entre os animais injetados com PBS e os demais grupos, # * $p < 0,5$ Log₁₀ representa diferença significativa entre os animais infectados com Mtb, vacinados ou não.

4.4.3. Histopatologia do parênquima pulmonar

A Figura 17 mostra fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de cobaias inoculadas com DNA encapsulado em microesferas de PLGA (mDNA ou mDNA-hsp65), contendo ou não o adjuvante DMT, como também seus respectivos controles, no 30º dia após a infecção pelo Mtb. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (HE). Animais controles foram inoculados com PBS.

Pode-se notar a integridade os alvéolos pulmonares e ausência de infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar dos animais no 30º dia após inoculação de PBS (Figura 17A). A administração de mDNA ou mDNA-hsp65, não induziu infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar de animais inoculados com PBS (Figuras 17D e 17G). Nos animais somente infectados houve intenso acúmulo de células no parênquima pulmonar, principalmente linfócitos e macrófagos (Figura 17B), similar ao observado em animais inoculados com mDNA sem adjuvante e infectados (Figura 17E) ou mDNA com adjuvante DMT (Figura 17F). A vacinação com mDNA-hsp65 sem adjuvante (Figura 17H), mDNA-hsp65 com adjuvante (Figura 17I) ou mDNA-hsp65 + mrHSP65 (“prime-boost”) (Figura 17C) reduziram o dano tecidual induzido pela infecção com Mtb, sendo encontradas áreas preservadas de parênquima pulmonar adjacentes aos infiltrados inflamatórios.

Figura 17 – Histopatologia do parênquima pulmonar. As fotomicrografias mostram cortes histológicos representativos do parênquima pulmonar de animais vacinados ou não com mDNA-hsp65 no 30º dia após infecção i.t. com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb). Animal inoculado com PBS i.t. (A); Mtb i.t. (B); mDNA-hsp65 + mrHSP65 i.m. e Mtb i.t. (C); mDNA i.m. e PBS i.t. (D); mDNA i.m. e Mtb i.t. (E); mDNA + DMT i.m. e Mtb i.t. (F); mDNA-hsp65 i.m. e PBS i.t. (G); mDNA-hsp65 i.m. e Mtb i.t. (H); mDNA-hsp65 + DMT i.m. e Mtb i.t. (I). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina. Aumento de 25x.

4.5. Análise morfométrica do parênquima pulmonar de cobaias infectadas *Mycobacterium tuberculosis*

A Figura 18 mostra análise morfométrica das lesões observadas no parênquima pulmonar de cobaias no 30º dia após a infecção com Mtb. Nos animais vacinados com BCG ou sDNA-hsp65 ou inoculados com o vetor em solução (sDNA) não foi verificada redução da lesão induzida pelo bacilo no pulmão. Entretanto, a formulação da vacina de DNA encapsulada em microesferas contendo o adjuvante DMT (mDNA-hsp65) e “prime-boost” foram capazes de diminuir o dano induzido pela infecção com Mtb.

Figura 18 – Análise morfométrica do parênquima pulmonar. A análise morfométrica foi realizada em 5 fragmentos do pulmão por grupo experimental. As imagens dos tecidos foram capturadas para o computador com câmera Olympus Q Color 3, acoplada a microscópio BX 40 (OLYMPUS OPTICAL CO, LTDA, JAPAN). A análise foi realizada com o auxílio do programa Image Tool (EVANS TECHNOLOGY, INC.). A média dos valores foi utilizada para cálculo da razão de lesão/área preservada do parênquima pulmonar.

Conclusões

A proposta deste trabalho foi avaliar o potencial profilático das vacinas Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) e DNA-hsp65 em solução (três doses), encapsulada em microesferas (dose única com liberação lenta do DNA) ou método “prime-boost” com microesferas (dose única com liberação rápida da proteína recombinante e lenta do DNA) em cobaias infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Para tanto, avaliamos a resposta inflamatória induzida pela infecção, uma vez que esta é fundamental para indução da resposta imune que pode ser protetora contra a micobactéria ou agravar o quadro clínico do indivíduo infectado.

O emprego da vacinação com BCG como medida profilática para a tuberculose (TB) tem sido alvo de muitas discussões. Diversos estudos em humanos ressaltam a variabilidade de proteção da BCG (0-80%) atribuída a diversos fatores como a padronização das cepas, diferenças genéticas entre as populações, contato anterior com micobactérias ambientais, dentre outros (FINE, 2001). Apesar do uso da BCG por muitas décadas na prevenção da TB, muitos estudos têm demonstrado que esta vacina protege crianças das formas severas da TB (meningite e miliar), porém em adultos é geralmente ineficaz (COLDITZ et al., 1994). Além disso, um grupo de pesquisadores demonstrou recentemente que a BCG reduz o número de lesões pulmonares e de bacilos recuperados de animais infectados com *M. bovis* de modo mais proeminente em relação aos animais infectados com Mtb (WILLIAMS et al., 2000).

Ao longo dos anos estratégias inovadoras, mais seguras, eficazes e até mesmo polivalentes na área do desenvolvimento de vacinas contra TB têm sido investigadas utilizando modernas técnicas de formulação e liberação de

antígenos na busca de uma que seja mais adequada que a vacina BCG. Vacinas de subunidades, que consistem de antígenos imunogênicos oriundos de *Mtb*, como Ag85, ESAT-6, MPT-63 e MPT-64, destacam-se como candidatas à vacina contra TB. No entanto essas vacinas são pouco imunogênicas em relação às aquelas baseadas em microrganismos atenuados (BRITTON & PALENDIRA, 2003). Deste modo, as vacinas de subunidade geralmente requerem a co-administração de adjuvantes para aumentar sua eficiência, dificultando seu uso em humanos, visto que dentre os diversos adjuvantes existentes somente o hidróxido de alumínio é aprovado para uso em humanos (REYN & VUOLA, 2002; BRITTON & PALENDIRA, 2003; OLSEN & ANDERSEN, 2003). No entanto, essas vacinas possuem a desvantagem de não serem totalmente seguras e apresentarem variações na eficácia protetora (ORME et al., 1999).

Recentemente surgiram as vacinas gênicas, nas quais plasmídeos de DNA atuam como vetores direcionando genes ou fragmentos gênicos codificadores de antígenos imunodominantes do patógeno à célula alvo e estimulando tanto a resposta humoral quanto celular (LOZES et al., 1997; GURUNATHAN et al., 2000; BRITTON & PALENDIRA et al., 2003; ROY et al., 2001; MUSTAFA et al., 2002). Estudos demonstram que a quantidade de antígeno produzido *in vivo* após vacinação com DNA varia de picogramas a nanogramas (GURUNATHAN et al., 2000). No entanto, apesar da pequena quantidade de proteína sintetizada o DNA é capaz de induzir eficiente resposta imune. Isso ocorre devido ao fato do próprio DNA apresentar sequências CpG espécie-específicas (KRIEG, 1996). Após a internalização do DNA, essas

sequências ativam a cascata de sinalização intracelular via receptor Toll 9 e promovem a ativação de NF- κ B e a secreção de IL-12 e IL-8 (HEMMI et al., 2000). Além das propriedades imunoestimulantes inerentes ao DNA (motivos CpGs), outros fatores como o tipo de célula transfectada favorecem o reconhecimento do peptídeo pelos linfócitos TCD $_4^+$ e TCD $_8^+$, auxiliando na indução da resposta imune. Além disso, a capacidade de induzir altos níveis de anticorpos indica que após a vacinação com DNA, o antígeno é expresso in vivo na sua conformação nativa, o que não ocorre quando vacinas de subunidades são utilizadas (GURUNATHAN, 2000). Após a vacinação, o material genético é incorporado às células musculares ou capturado por macrófagos e células dendríticas (AKBARI et al., 1999; GURUNATHAN et al., 2000). A transcrição e tradução do DNA inoculado ocorrem pelas vias metabólicas da célula hospedeira, resultando na produção do antígeno protéico relacionado ao agente infeccioso. Os antígenos endógenos são processados e os fragmentos resultantes ligam-se às moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e apresentados na superfície celular, possibilitando o reconhecimento e a ativação de linfócitos TCD $_8^+$ citotóxicos. Antígenos secretados podem induzir a produção de anticorpos ou podem ser endocitados por células transfectadas e posteriormente apresentados aos linfócitos T (GURUNATHAN et al., 2000). Os fragmentos resultantes do processamento dos antígenos são unidos às moléculas de classe II do MHC e apresentados na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs) para o reconhecimento e ativação de linfócitos TCD $_4^+$ auxiliares. As vacinas de DNA imitam os efeitos das vacinas vivas atenuadas em sua capacidade de

induzir resposta de células TCD8⁺ restritas às moléculas de MHC de classe I, característica vantajosa comparada às vacinas baseadas em proteínas, ao mesmo tempo em que abrandando as preocupações relativas à segurança inerentes às vacinas compostas por microrganismos vivos (GURUNATHAN et al., 2000). Outra importante característica das vacinas de DNA é que, assim como as vacinas de microrganismos vivos, este tipo de vacina permite a indução de imunidade adquirida, devido à constante produção de antígenos pela célula hospedeira e à capacidade destes estimularem a produção de linfócitos de memória (SILVA et al., 1999). Portanto, as vacinas de DNA podem induzir ambos os tipos de imunidade, humoral e celular, através da estimulação de linfócitos TCD₄⁺ e TCD₈⁺, com a vantagem de não apresentar risco de reversão da virulência, potencialmente inerente ao emprego de vacinas compostas por microrganismos vivos (SILVA & LOWRIE, 2000). Além disso, as vacinas de DNA são de fácil manejo e estocagem, o que reduz os custos de sua distribuição (GURUNATHAN et al., 2000).

Uma vacina com benefícios clínicos requer ao menos dois componentes, o primeiro que codifica o antígeno de interesse e o segundo, como os adjuvantes, que aumentam a resposta imune através do recrutamento e da ativação de APCs. Visto que grande parte do DNA em solução é degradada pouco tempo após sua administração, a resposta imune específica ao antígeno do DNA em solução pode ser dependente das APCs presentes no local durante a injeção (MANTHORPE et al., 1993).

Antes de iniciarmos os experimentos com as vacinas nós analisamos a cinética do recrutamento celular para o lavado broncoalveolar (LBA) e

parênquima pulmonar de cobaias desafiadas com Mtb. Nestes experimentos observamos aumento do recrutamento de neutrófilos para o LBA desde os primeiros dias até o 30º dia (Figura 3B) e células mononucleares no 15º dia após a infecção de cobaias recém-desmamadas (Figura 3C). Nossos dados demonstram que a infecção induziu recrutamento de células inflamatórias para o parênquima pulmonar desde os primeiros dias subseqüentes à infecção, com início da formação de granulomas no 15º dia e granulomas característicos no 30º dia (Figura 5). Vários trabalhos têm demonstrado que a infecção pelo Mtb é seguida por resposta inflamatória, caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , o qual atua no recrutamento de polimorfonucleares e fagócitos (TOOSSI, 2000). Appelberg e colaboradores (1992), demonstraram o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal por longo período de tempo após desafio com *M. avium*. No entanto, o papel dos neutrófilos nas infecções micobacterianas é ainda muito controverso. Embora estas células tenham sido identificadas como fontes de citocinas fundamentais para a indução de resposta celular e controle da multiplicação e disseminação do bacilo, sua função imunológica durante infecções micobacterianas nos pulmões é pouco conhecida (JONES et al., 1990; ELSBACH & WEISS, 1985). Após infecção com *M. bovis* tem sido descrito aumento no influxo de neutrófilos durante a fase aguda da infecção (NOURSHARGH et al., 1993; MENEZES-DE-LIMA-JÚNIOR et al., 1997). Além disso, a imunidade micobactericida nos pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com *M. bovis* foi aumentada pela presença de neutrófilos (FULTON et al., 2002). Mais recentemente foi demonstrado que leucotrienos produzidos

pelos neutrófilos auxiliam na fagocitose e morte de *M. bovis* (COFFEY et al., 2004). Embora os neutrófilos tenham importante papel na fase inicial de formação do granuloma, pesquisadores têm demonstrado que sua ausência não influencia na multiplicação e disseminação do bacilo (SEILER et al., 2003). Além disso, nos animais infectados verificamos a caquexia, outro parâmetro indicativo do desenvolvimento da doença (Figura 4), como ocorrido em camundongos estimulados com dimicolato de trealose (DMT), um glicolípido imunoestimulante presente na parede das micobactérias (SILVA E FACCIOLI, 1988).

Nosso próximo passo foi investigar o efeito das vacinas BCG e DNA hsp65 sobre o número de células presentes no LBA. Nossos dados mostram que a vacinação dos animais com BCG reduziu o número de neutrófilos recrutados para o LBA de animais infectados no 2º e 4º dias após a infecção, quando comparado com animais infectados (Figura 6B). Como demonstrado na Figura 6B, na fase tardia da infecção o recrutamento destas células não foi alterado pela vacinação prévia dos animais com BCG. Dados similares aos observados com o uso da vacina BCG foram verificados em cobaias após administração de três doses da vacina DNA-hsp65 em solução (sDNA-hsp65). Nos animais vacinados com sDNA-hsp65 o recrutamento de neutrófilos foi diminuído nos dias 1, 2, 4 e 60 após a infecção com *Mtb* (Figura 9A). Ao contrário, no 30º dia após a infecção foi observado aumento do número de neutrófilos nos animais vacinados com sDNA-hsp65, o qual poderia estar contribuindo para proteção reduzindo o número de bacilos presentes no órgão alvo da infecção.

O efeito profilático da vacina DNA-hsp65 já foi descrito anteriormente em camundongos. Nestes animais a vacina de DNA baseada no gene da proteína HSP65 de *M. leprae* foi capaz de estimular a resposta imune celular do padrão Th1, caracterizada por alta produção de IFN- γ pelas células TCD $_4^+$ e TCD $_8^+$ antígeno específicas por longo período após desafio com Mtb (SILVA & LOWRIE, 1994; SILVA et al., 1996; SILVA et al., 1999). Posteriormente, foi demonstrado que esta vacina apresenta também atividade terapêutica, podendo ser utilizada para o tratamento da tuberculose (LOWRIE et al., 1999). No entanto, os dados descritos na literatura até o momento referentes à vacina de DNA hsp65 foram realizados em camundongos, que são animais resistentes à infecção com Mtb, utilizando o vetor pcDNA3. Cobaias são animais altamente susceptíveis à infecção e apresentam características muito similares ao homem na patologia da tuberculose (TB), como progressão da doença, reações intensas ao teste cutâneo (DTH) e desenvolvimento de necroses caseosas nos pulmões. Além da maior susceptibilidade, os animais utilizados nesse trabalho não são isogênicos, representando de modo mais fidedigno a grande variabilidade genética da população mundial. Essas características do modelo experimental facilitam maior comparação com a resposta imune de pessoas que vivem em países em desenvolvimento, onde há grande necessidade de uma vacina efetiva contra TB. Além disso, é importante ressaltar que ao contrário do plasmídeo pcDNA3, o qual apresenta em sua composição o gene de resistência à ampicilina, neste trabalho foi utilizado o plasmídeo pVAX que apresenta o gene de resistência à kanamicina e está liberado para o uso em humanos.

Entretanto, nesses trabalhos foram necessárias três doses de DNA para que a vacina de DNA hsp65 tivesse efeito profilático ou terapêutico e a obtenção de grandes quantidades de DNA requer muitos gastos e pode comprometer o avanço das pesquisas e o possível emprego na população. Tem sido demonstrado que a liberação de microesferas contendo DNA é uma maneira eficaz de induzir imunidade, e em humanos tem sido mais eficiente que a administração de DNA em solução (ROY et al., 2001). Os sistemas de liberação controlada baseados em microesferas biodegradáveis têm a propriedade de aumentar a resposta imune ao antígeno por vetorizarem o mesmo às células fagocíticas, também atuam como estímulo pró-inflamatório, causando o influxo de fagócitos e células imunorregulatórias para o sítio da injeção, e permitem a liberação do antígeno por período prolongado (OKADA et al., 1995). Outra vantagem desse sistema é a redução do número de inoculações de antígenos utilizados nos protocolos de vacinação (LOFTHOUSE et al., 2002). O encapsulamento direciona o DNA ao fagolisossoma onde este liga-se aos receptores do tipo Toll (TLR9) através de seus motivos CPGs, sinalizando via NF- κ B e induzindo a secreção de citocinas IL-12 e IL-8 que são os maiores mediadores da resposta imune inata e adquirida (HEMMI et al., 2000; AKIRA et al., 2001). Outra característica é que as microesferas protegem o antígeno da destruição rápida *in vivo* por enzimas presentes no meio extracelular (ex: nucleases) e a resposta imune ao DNA em solução é dependente de APCs (IWASAKI et al., 1997; DONELLY et al., 1997; WANG et al., 1999). Além disso, algumas características físico-químicas das microesferas contribuem para a potencialização da resposta imune, tais como,

tamanho, hidrofobicidade e composição (TABATA & IKADA, 1988). O tamanho das microesferas é fundamental nas formulações vacinais, uma vez que este pode afetar a liberação do antígeno, o tipo celular recrutado para o sítio de injeção e a captura dessas partículas. As células apresentadoras de antígeno (APCs) conseguem englobar partículas menores que 10 μm por fagocitose ou pinocitose, permitindo que o antígeno seja liberado no meio intracelular processado e apresentado via MHC I e II para os linfócitos TCD_4^+ e TCD_8^+ e induzir resposta imune efetiva e duradoura (MEN et al., 1999). Nesse estudo foram utilizadas microesferas de PLGA contendo os plasmídeos pVAX, pVAX-hsp65 ou a proteína recombinante HSP65 encapsulados na matriz polimérica PLGA. Primeiramente, as microesferas foram caracterizadas e as análises de tamanho mostraram que todas as partículas apresentaram diâmetros inferiores a 10 μm (Tabela 2). Também foram feitas as dosagens de DNA e proteína encapsulados pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente no preparo de diferentes formulações de microesferas. Esse método não causa nenhuma lesão às moléculas que possa comprometer a apresentação ao sistema imune (CLELAND et al., 1994). Lima e colaboradores (2003) demonstraram a presença de mRNA para HSP65 no músculo, linfonodos e baço de camundongos, 15 dias após uma única administração de microesferas contendo DNA-hsp65.

De modo a simplificar o protocolo de vacinação com a vacina de DNA-hsp65 e reduzir a quantidade de DNA-hsp65 empregada na vacinação foi desenvolvido um sistema de encapsulamento do DNA em microesferas de polímero de ácido poli-lático e poli-glicólico (PLGA). Este sistema de liberação

controlada do DNA foi capaz de induzir aumento dos níveis de anticorpos IgG2a e altos níveis de IFN- γ em camundongos. Além disso, a resposta protetora foi similar à observada em camundongos vacinados com três doses do DNA não encapsulado, sendo necessário apenas 10% da quantidade anteriormente empregada (LIMA et al., 2003). Ao contrário do observado com a administração da vacina de DNA-hsp65 em solução, a presença de neutrófilos no 30º dia após a infecção não é um marcador específico da resposta imune induzida em animais infectados e inoculados com microesferas. Como demonstrado na Figura 9A, o número de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar foi aumentado somente em animais vacinados com uma única dose da vacina DNA hsp65 encapsulada em microesferas contendo o adjuvante DMT (mDNA-hsp65 + DMT). Ao contrário do ocorrido em animais vacinados com sDNA-hsp65, quando a vacina mDNA-hsp65 foi administrada a infecção não induziu aumento de neutrófilos, exceto nos animais vacinados com a formulação contendo o gene para HSP65 juntamente com o adjuvante (mDNA-hsp65 + DMT).

Além do encapsulamento da vacina de DNA hsp65 em microesferas, também tem sido investigada a estratégia de "prime-booster", cuja formulação consiste da mistura de duas diferentes microesferas de PLGA administradas em uma única dose, compostas por componentes de liberação rápida e lenta, DNA e proteína, respectivamente. Nessa estratégia, apesar de uma única dose de vacina, o sistema imune é estimulado duas vezes. Na primeira vez (prime) pela vacina mDNA-hsp65 em virtude da liberação do DNA ocorrer até 15 dias após a inoculação. Na segunda vez (booster) pela proteína HSP65

recombinante, a qual apresenta um período de liberação mais lento, iniciando em cerca de 15 dias e persistindo até aproximadamente 45 dias após a inoculação dos animais (LIMA et al., 2003). A formulação da vacina de DNA hsp65 contida em microesferas de PLGA adsorvidas com dimicolato de trealose (DMT) foi capaz de induzir resposta imune protetora de longa duração, aumentando o número de células TCD_4^+ e TCD_8^+ de memória específica e reduzindo o número de bacilos no pulmão de camundongos infectados com *Mtb* (RUBERTI et al., 2004). Assim, a estratégia de “prime-booster” com o uso de microesferas é uma maneira promissora de estimular a resposta imune duradoura. Nós também avaliamos a estratégia de “prime-booster” através da administração de uma única dose da vacina DNA-hsp65, cuja formulação consiste da mistura de duas diferentes microesferas, uma contendo DNA-hsp65 e outra proteína HSP65 recombinante. Nossos dados mostram aumento do número de neutrófilos recrutados para o LBA no 30º dia após a infecção nos animais vacinados com a estratégia de “prime-booster” (mDNA-hsp65 + rHSP65), similar ao ocorrido em animais vacinados com mDNA-hsp65 + DMT e infectados (Figura 15A).

Outro parâmetro avaliado neste trabalho foi a recuperação de unidades formadoras de colônia (UFCs). Nossos dados demonstram que a vacinação dos animais com BCG não reduziu o número de bacilos recuperados do pulmão de animais infectados (Figura 7). A ineficiência da vacina BCG em induzir proteção contra o desafio com *Mtb* pode ser explicada pelo fato de que quando a vacinação com BCG é utilizada, a imunidade celular desenvolve-se num microambiente de padrão misto de resposta, com altos níveis de IL-4 e

IFN- γ nos linfonodos e leva à perda da capacidade citotóxica das células T e à redução da diferenciação de células de memória. Além disso, os linfócitos T passam a produzir citocinas do padrão Th2, que suprimem a resposta imune celular (SILVA et al., 1999). No entanto, após administração da vacina sDNA-hsp65 foi observada redução do número de bacilos recuperados dos pulmões no 30º e 60º dia após a infecção com Mtb (Figura 10). Dados similares foram também observados após a vacinação dos animais com a vacina DNA-hsp65 encapsulada em microesferas. O uso da formulação mDNA-hsp65 + DMT e da estratégia de "prime-booster, foi capaz de induzir proteção das cobaias frente à infecção pelo Mtb, como demonstrado pela diminuição do número de UFCs recuperadas nos pulmões (Figura 16).

A identificação das citocinas expressas após infecção pode ser útil para o melhor entendimento do processo infeccioso. *M. tuberculosis* reside no fagossomo, local onde antígenos secretados são processados e associados ao complexo de histocompatibilidade principal. Essa via é essencial para induzir linfócitos TCD₄₊ que produzem IFN- γ , que é uma citocina crucial para a proteção contra tuberculose. Neste trabalho foi também observado aumento das citocinas IL-2 e IL-10 no sobrenadante do lisado do parênquima pulmonar de animais vacinados com sDNA-hsp65 no 30º dia após a infecção com Mtb (Figura 11). Além dessas citocinas, também foi verificado aumento na expressão de mRNA para IFN- γ nas células do pulmão de animais vacinados com sDNA-hsp65 e infectados com Mtb, sugerindo que esta citocina pode estar envolvida na imunidade anti-micobacteriana observada no 30º dia após a infecção (Figura 12). Esses dados são coerentes com outros previamente

publicados por BONATO e colaboradores (1998) que observaram aumento dos níveis de mRNA para IFN- γ nos linfonodos de camundongos vacinados com DNA hsp65 em solução.

Vários trabalhos têm investigado quais moléculas de superfície celular as células do sistema imune passam a expressar após ativação. O efeito protetor da vacina de DNA hsp65 contra Mtb em camundongos foi associado à forma como o antígeno é apresentado ao sistema imune. Na tentativa de avaliar as subpopulações celulares presentes no pulmão de cobaias infectadas e vacinadas e descobrir se alguma dessas populações torna-se modificada pelo uso da vacina de DNA hsp65 em cobaias, realizamos um ensaio de citometria de fluxo com anticorpos murinos ou humanos para moléculas de superfície celular de cobaias. No entanto, não obtivemos sucesso com este experimento em virtude da inespecificidade dos anticorpos empregados (anticorpos específicos para CD4 e CD8 de camundongos e humanos). Em camundongos, o estudo das subpopulações de linfócitos mostrou que linfócitos TCD₈⁺ estimulados pela vacinação com DNA hsp65 são capazes de destruir células infectadas pelo Mtb (BONATO et al., 1998). Além disso, linfócitos TCD₄⁺ também apresentam a capacidade de secretar altas concentrações de IFN- γ após imunização com DNA hsp65 (LOWRIE et al., 1994, 1995, 1997; BONATO et al., 1998). Outro fato notável é que ambas subpopulações de linfócitos T expressam com maior intensidade a molécula CD₄₄, característica de células de memória (SILVA et al., 1999).

Avaliamos também o efeito das vacinas BCG e DNA hsp65 sobre a histopatologia do parênquima pulmonar de animais infectados com Mtb. O

parênquima pulmonar de animais vacinados com BCG e infectados apresentou dano tecidual similar ao observado nos animais infectados (Figura 6). Embora a vacina sDNA-hsp65 tenha diminuído o número de UFCs recuperadas dos pulmões de animais infectados, a mesma não reduziu a lesão do parênquima pulmonar induzida pelo desafio com Mtb (Figuras 13 e 14). Ressaltamos, ao contrário do ocorrido com a administração da vacina DNA hsp65 em solução, a análise da histopatologia do parênquima pulmonar de animais vacinados com mDNA-hsp65 + DMT, infectados com Mtb demonstrou redução do número e tamanho dos granulomas (Figuras 17 e 18). Também, a extensão da lesão e o número de granulomas induzidos pela infecção com Mtb foi reduzida pela vacinação com mDNA-hsp65 + rHSP65 (Figuras 17 e 18).

Os dados apresentados neste trabalho contribuem para o melhor entendimento das respostas inflamatória e imune observadas em animais susceptíveis à infecção com Mtb. Ao contrário do esperado, nossos dados demonstram que a vacinação com BCG não impede a formação de granulomas no parênquima pulmonar de cobaias infectadas. O emprego de BCG como medida profilática da tuberculose em cobaias parece não resultar em resposta protetora, visto que em nosso modelo esta vacina não foi capaz de diminuir a recuperação de UFC dos pulmões e também não impediu a formação de granulomas. Já a inoculação direta de DNA hsp65 no músculo mostrou-se eficaz na redução do número de UFCs recuperadas do pulmão de animais infectados mas não impediu a lesão tecidual resultante da infecção. Apesar do aumento do número de neutrófilos observado no 30º dia após a infecção sugerir a participação destas células na indução de resposta protetora induzida

pela vacina sDNA-hsp65, a presença destas células não impediu a formação de granulomas e consequentemente as lesões do parênquima pulmonar, que dificultam as trocas gasosas e podem causar a morte do animal infectado. Além disso, a vacinação com DNA-hsp65 utilizando o sistema de liberação controlado do DNA por microesferas biodegradáveis mostrou-se eficaz na redução do número de UFCs e também da lesão do parênquima pulmonar induzida pela infecção. De modo similar, também a estratégia de “prime-boost” foi capaz de proteger as cobaias da infecção com Mtb. Portanto, entre as vacinas e formulações analisadas neste trabalho, a vacina de DNA-hsp65 encapsulada em microesferas contendo o adjuvante DMT e também a estratégia de “prime-boost” mostraram o maior efeito na proteção contra o bacilo Mtb. O mecanismo exato pelo qual o sistema de liberação do DNA por microesferas aumenta a imunidade frente à infecção com a micobactéria permanece ainda a ser esclarecido, mas os resultados aqui demonstrados por terem sido avaliados em animais susceptíveis à infecção sugerem que esta pode ser uma abordagem promissora no desenvolvimento de novas vacinas contra TB para o uso em humanos.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, D.O. The granulomatous inflammatory response. A review. **Am. J. Pathol.**, v. 84, p. 164-191, 1976.
- AKBARI, O.; PANJWANI, N.; GARCIA, S.; TASCONE, R.; LOWRIE, D.; STOCKINGER, B. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.*, v. 189. p. 169-178, 1999.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 675-680, 2001.
- APPELBERG, R. T cell regulation of the chronic peritoneal neutrophilia during mycobacterial infections. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 89, p. 120-125, 1992.
- BANNON, M.J. BCG and tuberculosis. **Arch. Dis. Child.**, v. 80, p. 80-83, 1999.
- BEAN, A.G.D.; ROACH, D.R. ; BRISCOE, H.; FRANCE, M.P.; KORNER, H.; SEDGWICK, J.D.; BRITTON, W.J. Structural deficiencies in granulomas formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J. Immunol.**, v. 162 (6), p. 3504-11, 1999.
- BONATO, V.L.; LIMA, V.M.; TASCONE, R.E.; LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect. Immun.* v. 66, p. 169-175, 1998.
- BOOM, W.H.; CANADAY, D.H.; FULTON, S.A.; GEHRING, A.J.; ROJAS, R.E.; TORRES, M. Human immunity to *Mycobacterium tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis**, v. 86, p. 98-106, 2003.

- BRITTON, W.J.; PALENDIRA, U. Comparison of the protective efficacy of bacille calmette-Guerin vaccination against aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. **Clin Infect Dis.** v. 30, p. S299-301, 2000.
- BROWN, M.C.; TAFFET, S.M. Lipoarabinomannans derived from different strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially stimulate the activation of NF-kappa B and KBF1 in murine macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1960-1968, 1995.
- CHACKERIAN, A.A.; THUSHARA, V.P.; BEHAR, S.M. Gamma Interferon-Producing CD₄⁺ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2666-2674, 2001.
- CHUNG, K.T.; BIGGERS, C.J. Albert Léon Charles Calmette (1893-1933) and the antituberculous BCG vaccination. **Perspect. Biol. Med.**, v. 44, p. 379-389, 2001.
- CLELAND, J.L.; POWELL, M.F.; LIM, A.; BARRON, L.; BERMAN, P.W.; EASTMAN, D.J.; NUNBERG, J.H.; WRIN, T.; VENNARI, J.C. Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 10, p. S21-26, 1994.
- CLEMENS, D.L.; HORWITZ, M.A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 2243-2247, 1993.
- COFFEY, M.J.; PHARE, S.M.; PETERS-GOLDEN, M. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**. v. 71, p. 185-190, 2004.

- COLDITZ, G.A.; BREWER, T.F.; BERKEY, C.S.; WILSON, M.E.; BURDICK, E.; FINEBERG, H.V.; MOSTELLER, F. **J. Am. Med. Assoc.** 271, 698-702, 1994.
- COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGIMEIER, K.; GAS, S.; BARRY III, C.E.; TEKIA, 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, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, v. 393, p. 537-544, 1998.
- COOPER, A.M.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; GRIFFEN, J.P.; RUSSELL, D.G.; ORME, I.M. Disseminated tuberculosis in IFN- γ gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, v.178, p. 2243-2248, 1993.
- DANNENBERG, A.M. JR. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Hosp. Pract.**, v. 28, p. 51-58, 1993.
- DANNENBERG, A.M. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Rev. Infect. Dis.**, v.11, p. S369-378, 1989.
- DING, A.H.; NATHAN, C.; STUEHR, D. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.
- DONNELLY, J.J.; ULMER, J.B.; SHIVER, J.W.; LIU, M.A. DNA vaccines. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 617-648, 1997.

DYE, C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P.; PATHANIA, V.; RAVIGLIONE, M.C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence and mortality by country. **J. Am. Med. Assoc.** v. 282, pp. 677–686, 1999.

ELSBACH, P.; WEISS, J. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol. Lett.*, v. 11, 159-163, 1985.

FENTON, M.J.; VERMEULEN, M.W.; KIM, S.; BURDICK, M.; STRIETER R.M.; KORNFIELD, H. Induction of Gamma Interferon Production in Human Alveolar Macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 5149-5156, 1997.

FINE, P.E.; FLOYD, S.; STANFORD, J.L.; NKHOSA, P.; KASUNGA, A.; CHAGULUKA, S. WARNDORFF, D.K.; JENKINS, P.A.; YATES, M.; PONNIGHAUS, J.M. Environmental mycobacteria in northern Malawi: implications for the epidemiology of tuberculosis and leprosy. **Epidemiol. Infect.** v. 126, p. 379-387, 2001.

FINE, P.E.M. **Rev. Infect. Dis.** v. 11, p. S353-S359, 1989.

FLEISCHMANN, R.D.; ALLAND, D.; EISEN, J.A.; CARPENTER, L.; WHITE, O.; PETERSON, J.; DEBOY, R.; DODSON, R.; GWINN, M.; HAFT, D.; HICKEY, E.; KOLONAY, J.F.; NELSON, W.C.; UMayAM, L.A.; ERMOLAEVA, M.; SALZBERG, S.L.; DELCHER, A.; UTTERBACK, T.; WEIDMAN, J.; KHOURI, H.; GILL, J.; MIKULA, A.; BISHAI, W.; JACOBS, JR.; WR, JR.; VENTER, J.C.; FRASER, C.M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5479-5490, 2002.

- FLESCH, I.; KAUFMANN, S.H. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 138, p. 4408-4413, 1987.
- FLYNN, J.L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; BLOOM, B.R. An essential role for interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 2249-2254, 1993.
- FLYNN, J.L.; CHAN, J. What's good for the host is good for the bug. **Trends Microbiol.** v. 13, p. 98-102, 2005.
- FLYNN, J.L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, v. 84, p. 93-101, 2004.
- FULTON, S.A.; REBA, S.M.; MARTIN, T.D.; BOOM, W.H. Neutrophil-mediated mycobacteriocidal immunity in the lung during *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5322-5327, 2002.
- GINSBURG, A.M. What's new in tuberculosis vaccines? **Bull. Who**, v. 80, p. 483-488, 2002.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, R.A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 927-974, 2000.
- HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, p. 740-745, 2000.

HESS, J.; KAUFMANN, S.H.E. Development of novel tuberculosis vaccine. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v. 322, p. 953-958. 1999.

HINGLEY-WILSON, S.M. The immunobiology of the mycobacterial infected macrophage. **Mod. Asp. Immunobiol.**, v. 1, p. 96-101, 2000.

IWASAKI, A.; TORRES, C.A.; OHASHI, P.S.; ROBINSON, H.L.; BARBER, B.H. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. **J. Immunol.**, v. 159, p. 11-14, 1997.

JONES, G.S.; AMIRALTY, H.J.; ANDERSEN, B.R. Killing of Mycobacterium tuberculosis by neutrophils: a nonoxidative process. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 700-704, 1990.

KAUFMANN, S.H.; VATH, U.; THOLE, J.E.; VAN EMBDEN, J.D.; EMMRICH, F. Enumeration of T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. **Eur J Immunol.**, v. 17, p. 351-357, 1987.

KRIEG, A.M. An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 128, p. 128-133, 1996.

LAW, K.; WEIDEN, M.; HARKIN, T.; TCHOU-WONG, K.; CHI, C.; ROM, W.N. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavage from sites in pulmonary tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 153, p. 799-804, 1996.

LEWTHWAITE, J.; SKINNER, A.; HENDERSON, B. Are molecular chaperones microbial virulence factors? **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 426-428, 1998.

LIMA KM, SANTOS SA, LIMA VM, COELHO-CASTELO AA, RODRIGUES JM JR, SILVA CL. vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene Ther.**, v. 10, p. 678-685, 2003.

LIMA, V.M.F.; BONATO, V.L.D.; LIMA, K.M.; DOS SANTOS, S.A.; DOS SANTOS, R.R.; GONÇALVES, E.C.; FACCIOLI, L.H.; BRANDÃO, I.T.; RODRIGUES-JÚNIOR, J.M.; SILVA, C.L. Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5305-5312, 2001.

LOFTHOUSE, S. Immunological aspects of controlled antigen delivery. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 54, p. 863-870, 2002.

LOZES, E.; HUYGEN, K.; CONTENT, J.; DENIS, O.; MONTGOMERY, D.L.; YAWMAN, A.M.; VANDENBUSSCHE, P.; van VOOREN, J.P.; DROWART, A.; ULMER, J.B.; LIU, M.A. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. **Vaccine**. v. 15, p. 830-833, 1997.

LOWRIE, D.B.; TASCAN, R.E.; BONATO, V.L.; LIMA, V.M.; FACCIOLI, L.H.; STAVROPOULOS, E.; COLSTON, M.J.; HEWINSON, R.G.; MOELLING, K.; SILVA, C.L. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature**, v. 400, p. 269-271, 1999.

LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L.; TASCAN, R.E. DNA vaccines against tuberculosis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 75, p. 591-594, 1997.

LOWRIE, D.B.; TASCAN, R.E.; SILVA, C.L. Vaccination against tuberculosis. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 108, p. 309-312, 1995.

LOWRIE, D.B.; TASCON, R.E.; COLSTON, M.J.; SILVA, C.L. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. **Vaccine**, v. 12, p. 1537-1540, 1994.

MANTHORPE, M.; CORNEFERT-JENSEN, F.; HARTIKKA, J.; FELGNER, J.; RUNDELL, A.; MARGALITH, M.; DWARKI, V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. **Hum. Gene. Ther.**, v. 4, p. 419-431, 1993.

McMURRAY, D.N. A coordinated strategy for evaluating new vaccines for human and animal tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, p. 141-146, 2001.

McMURRAY, D.N.; COLLINS, F.M.; DANNENBERG, A.M. JR.; SMITH, D.W. Pathogenesis of experimental tuberculosis in animal models. **Curr. Topics. Microbiol. Immunol.** v. 215, p. 157-179, 1996.

McMURRAY, D.N. Guinea pig model of tuberculosis. In: B.R. Bloom, Editor, Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, American Society for Microbiology, p. 135–147, 1994.

MEN, Y.; AUDRAN, R.; THOMASIN, C.; EBERL, G.; DEMOTZ, S.; MERKLE, H.P.; GANDER, B.; CORRADIN, G. MHC class I- and class II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens. **Vaccine**, v. 17, p. 1047-1056. 1999.

MENEZES-DE-LIMA-JUNIOR, O.; WERNECK-BARROSO, E.; CORDEIRO, R.S.; HENRIQUES, M.G. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy. **J. Leukoc. Biol.**, v. 62, p. 778-785, 1997.

MITCHISON DA. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. **Tubercle**, v. 66, p. 219-225, 1985.

- MUSTAFA, A.S.; LUNDIN, K.E.; MELOEN, R.H.; SHINNICK, T.M.; OFTUNG, F. Identification of promiscuous epitopes from the Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein recognized by human CD4(+) T cells of the Mycobacterium leprae memory repertoire. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5683-5689, 1999.
- MUSTAFA, A.S.; LUNDIN, K.E.; MELOEN, R.H.; SHINNICK, T.M.; COULSON, A.F.; OFTUNG, F. HLA-DR4-restricted T-cell epitopes from the mycobacterial 60,000 MW heat shock protein (hsp 60) do not map to the sequence homology regions with the human hsp 60. **Immunology**, v. 87, p. 421-427, 1996.
- NAU, G.J.; GUILFOILE, P.; CHUPP, G.L.; BERMAN, J.S.; KIM, S.J.; KORNFIELD, H.; YOUNG, R.A. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 6414-6419, 1997.
- NOLTE, R.J.; METCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, F.H. (ed) **Manual of clinical microbiology**, v. 164, p. 3476-3479, 2000.
- NOURSHARGH, S. Mechanisms of neutrophil and eosinophil accumulation *in vivo*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 148, p. S60-64, 1993.
- OLSEN, A.N.; ANDERSEN P. A novel TB vaccine; strategies to combat a complex pathogen. **Immunol. Lett.**, v. 85, p. 207-211, 2003.
- ORME, I.M. New vaccines against tuberculosis. The status of current research. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** v. 13, p. 169-185, 1999.

- ORME, I.M.; McMURRAY, D.N. Immune responses to tuberculosis in animal models. In: W.N. Rom and S. Garay, Editors, **Tuberculosis**, Little, Brown & Co., p. 269–280, 1996.
- ORME I.M.; COLLINS, F.M. Mouse model of tuberculosis. In: B.R. Bloom, Editor, **Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control**, **American Society for Microbiology**, p. 113–134, 1994.
- REED, S.; LOBET, Y. Tuberculosis vaccine development: from mouse to man. **Microbes and Infect.**, v. 7, p. 922-931, 2005.
- von REYN, C.F.; VUOLA, J.M. New vaccines for the prevention of tuberculosis. **Clin. Infect. Dis.** v. 35, p. 465-474, 2002.
- RILEY, R.L.; MILLS, C.C.; NYKA, W.; WEINSTOCK, U.; STORCY, P.B.; SULTAN, L.U.; RILEY, M.C.; WELLS, W.F. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two year study of contagion in tuberculosis ward. **Amer. J. Hyg.**, v. 70, p. 185-196, 1959.
- RUBERTI, M.; DE MELO, L.K.; DOS SANTOS, S.A.; BRANDAO, I.T.; SOARES, E.G.; SILVA, C.L.; JUNIOR, J.M. Prime-boost vaccination based on DNA and protein-loaded microspheres for tuberculosis prevention. **J. Drug Target.** v. 12, p. 195-203, 2004.
- RUSSEL, D.G. Of microbes and macrophages: entry, survival and persistence. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, p. 479-484, 1995.
- SAUNDERS, B.M.; FRANK, A.A.; ORME, I.M.; COOPER, A.M. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the specific lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3322-3326, 2000.

- SEILER, P.; AICHELE, P.; BANDERMANN, S.; HAUSER, A.E.; LU, B.; GERARD, N.P.; GERARD, C.; EHLERS, S.; MOLLENKOPF, H.J.; KAUFMANN, S.H.E. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 2676-2686, 2003.
- SILVA, C.L.; BONATO, V.L.D.; LIMA, K.M.; COELHO-CASTELO, A.A.M.; FACCIOLI, L.H.; SARTORI, A.; DE SOUZA, A.O.; LEÃO, S.C. Cytotoxic T cells and mycobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, p. 11-18, 2001.
- SILVA CL, LOWRIE DB. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* v. 68, p. 3269-3274, 2000.
- SILVA, C.L.; BONATO, V.L.; LIMA, V.M.; FACCIOLI, L.H.; LEAO, S.C. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. **Immunology**. v. 97, p. 573-581, 1999.
- SILVA, C.L.; SILVA, M.F.; PIETRO, R.C.; LOWRIE, D.B. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 2400-2407, 1996.
- SILVA CL, LOWRIE DB. A single mycobacterial protein (hsp 65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. **Immunology**. v. 82, p. 244-248, 1994.
- SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Tumor necrosis factor (cachectin) mediates induction of cachexia by cord factor from mycobacteria. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 3067-3071, 1988.

SPARGO, B.J.; CROWE, L.M.; IONEDA, I., BEAMAN, B.L.; CROWIE, J.H. Cord factor trehalose 6-6-dymicolate inhibits fusion between phospholipid vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 737-740, 1991.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. **Biomaterials**, v. 9, p. 356-362, 1988.

TODRYK, S.M.; MELCHER, A.A.; DALGLEISH, A.G.; VILE, R.G. Heat shock proteins refine the danger theory. **Immunology**, v. 99, p. 334-337, 2000.

TOOSSI, Z. The inflammatory response in *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 48, p. 513-519, 2000.

WILLIAMS, A.; DAVIES, A.; MARSH, P.D.; CHAMBERS, M.A.; HEWINSON, R.G. Comparison of the protective efficacy of bacille calmette-Guerin vaccination against aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. **Clin Infect Dis.** v. 30, p. S299-301, 2000.

WORLD HEALTH REPORT. Health Systems: improving performance. **WHO**, Geneva, Switzerland, 2000.

Anexos